

Humboldt-Universität zu Berlin

Dissertation

Einfluss von Selenoprotein P auf die intestinale Tumorigenese im Mausmodell

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Marten Michaelis, Master of Science

Dekan: Prof. Dr. rer. nat., habil. Lutz-Helmut Schön

Gutachter:

1. Prof. Dr. Werner Kloas
2. Prof. Dr. Josef Köhrle
3. Prof. Dr. Gudrun A. Brockmann

Datum der Promotion: 25. Juli, 2008

Zusammenfassung

Das essentielle Spurenelement Selen (Se) wird als einziges Spurenelement über den genetischen Code als Bestandteil der 21. proteinogene Aminosäure Selenocystein (SeCys) in eine kleine Gruppe von Proteinen eingebaut. Als Bestandteil des aktiven Zentrums dieser Selenoproteine ist Se bzw. SeCys essentiell für deren Funktion. Die Biosynthese der Selenoproteine ist durch eine Reihe von Besonderheiten gekennzeichnet, so z.B. durch eine hierarchisch abgestimmte Versorgung der unterschiedlichen Organe mit dem limitierenden Spurenelement bzw. durch eine hierarchische Versorgung der einzelnen Selenoproteine während ihrer Biosynthese. Für die biologische Verwertung und Verteilung ist das Selenoprotein SePP von zentraler Bedeutung. Transkriptomanalysen haben aufgezeigt, dass gerade in Tumoren die Expression von SePP stark erniedrigt ist. In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit der Verlust von SePP einen kausalen Einfluss auf die Tumorigenese nimmt. Hierzu wurden zwei transgene Mausmodelle verkreuzt: zum einen Mäuse mit einem partiellen bzw. kompletten genetischen Verlust der SePP-Expression und zum anderen Mäuse mit einer Mutation im APC-Tumorsuppressorgen, welche multiple intestinale Neoplasien (Min) auslöst und als Paradigma in der experimentellen Darmkrebsforschung dient.

Der komplette Verlust des SePP-Gens bewirkte eine stark erhöhte Tumorrare im Dünndarm der APCmin-Mäuse. Hierdurch konnte SePP als neuer wichtiger Modulator der APC-abhängigen Tumorigenese etabliert werden. Interessanterweise genügte bereits der Verlust eines einzelnen SePP-Allels, um mehr, größere und weniger differenzierte Adenome im Dünndarm entstehen zu lassen. Diese Beobachtung deutet auf einen entscheidenden Gen-Dosis-Effekt von SePP für die intestinale Tumorigenese hin und könnte damit als weiteres sinnvolles Kriterium zur Feindiagnostik von Darmkrebs dienen. Die molekularbiologischen Untersuchungen der Tumore lassen eine Aktivierung von Zellzyklus-, Angiogenese- und Akutphaseprozessen vermuten. Hierdurch und über die erhöhte Produktion von Wachstumsfaktoren kann die vermehrte Tumorigenese bei SePP-Mangel erklärt werden. Weitergehend konnte auch der Darm, ungeachtet seiner primären Rolle bei der Selenaufnahme, als abhängig von einer regulären SePP-Expression erkannt werden. Somit stellt sich SePP als zentraler Vermittler des Selenmetabolismus dar, und könnte auf lange Sicht als funktioneller Biomarker des Selenstatus für die individuelle Risikoabschätzung etabliert werden.

Abstract

Selenium (Se) is the only trace element which is encoded in the genome as the 21st proteinogenic amino acid selenocystein (Sec). Se is essential for the catalytic activity of the small group of Sec-containing selenoproteins. The biosynthesis of this group of extraordinary proteins is characterized by several specialities, e.g. the distribution of Se differs between the organs giving rise to a hierarchical biosynthesis of the selenoproteins and there is an intra-cellular hierarchy of selenoprotein biosynthesis in times of Se depletion. One particular selenoprotein is of central importance for the organification and trafficking of Se within the organism, i.e., Selenoprotein P (SePP). From transcriptome analyses it was deduced that this Se transport protein is markedly reduced in tumours of several origins.

The aim of this thesis was to elucidate whether SePP has a causal impact on the tumourigenesis within the intestinal tract. For this purpose, the SePP-KO mouse model with a genetically impaired SePP expression was crossed with the well-established APCmin intestinal tumour model. A stop mutation in the APC tumour suppressor gene causes multiple intestinal neoplasias (Min) in these mice.

The combined deletion of SePP caused a sharp increase in tumour incidence in the small intestines of APCmin mice. Interestingly, even the inactivation of only one SePP allele was sufficient to induce more and less well differentiated adenomas in the small intestine. These results indicate that SePP acts as an important modulator of APC dependent tumorigenesis in a gene dose dependent manner. In the long run, SePP might turn out as another valuable biomarker to estimate the individual cancer risk.

From a mechanistic point of view, the transcriptome analyses indicate that an impaired SePP expression favors cell cycle progression, angiogenesis and acute phase response. In addition, an elevated production of growth factors in response to SePP deficiency might contribute to the phenotype of bigger and more undifferentiated tumours.

Additional analyses of the intestines revealed that the intestinal tract is dependent on a regular SePP expression in order to synthesise its regular set of selenoproteins even so it represents the prime organ of Se absorption. Therefore, SePP represents a central Se transport and storage protein also within the intestinal tract, highlighting its essential role to preserve health and regular Se metabolism.

Schlagwörter:

Selen, Selenoprotein P, SePP, Sepp1, Kerbs, Darmkrebs, Adenomatöse Polyposis Coli, APC, Multiple Intestinale Neoplasie, min, APCmin, APCmin/+, Familiäre adenomatöse Polyposis, FAP

Keywords:

Selenium, Selenoprotein P, SePP, Sepp1, Cancer, colo rectal cancer, gastro intestinal cancer, Adenomatous Polyposis coli, APC, multiple intestinal neoplasia, min, APCmin, APCmin/+, Familial adenomatous polyposis, FAP

Abkürzungsverzeichnis

APC	adenomatöse Polyposis coli (Adenomatous Polyposis coli)
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
C57BL/6j	Inzucht-Mausstamm „Black 6“
cDNA	komplementäre DNA
Col	Colon
Ct	Schwellenwert in der qRT-PCR (engl. threshold cycle)
d	Tage
ddH ₂ O	zweifach demineralisiertes Wasser
DAN	2,3-Diaminonaphthalin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dio	Iod-L-thyronin-Deiodase
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. desoxyribonucleic acid)
DTT	DL-Dithiothreitol
DüDa	Dünndarm
ECL	verstärktes Chemilumineszenz System (engl. Enhanced chemiluminescence system)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eEFsec	Selenocystein-spezifischer eukaryotischer Elongationsfaktor
EtBr	Ethidiumbromid
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FC	Fold change (relative Änderung bezogen auf eine Kontrollgruppe)
GPx	Glutathionperoxidase
GPx1	Glutathionperoxidase 1 (zytosolisch)
GPx2	Glutathionperoxidase 2 (gastrointestinal)
GPx3	Glutathionperoxidase 3 (plasmatisch)

GPx4	Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase 4
GIT	Gastrointestinaltrakt
GSH	Glutathion (reduzierte Form)
GTC	Guanidinisothiocyanat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
het	heterozygot
His	Histidin
HRP	Meerrettich Peroxidase (engl. horseradish peroxidase)
GSSG	Diglutathion, oxidiertes Glutathion
KO	genetische Inaktivierung (engl. knock out)
LOH	Loss of heterozygosity
M	Molarität (M = mol / l)
Min	Multiple Intestinale Neoplasie
MM	MisMatch
MOPS	4-Morpholinpropan sulfonsäure
NMD	Nonsense-mediated decay
mRNA	engl. messenger RNA
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PM	engl. Perfect Match
PP	Probenpaar
ppm	Teile pro Million (parts per million)
qRT-PCR	quantitative Reverse- Transkriptions-Gekoppelte PCR
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rRNA	ribosomale RNA
ROS	engl. Reactive oxygen species

RT	Raumtemperatur
SBP2	SECIS-bindende Protein 2
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)
Se	Selen
Sec, SeCys	Selenocystein
Ser	Serin
SECIS	Selenocystein Insertionsequenz (engl. selenocysteine insertion sequence)
SeMet	Selenomethionin
SPS2	Selenophosphat-Synthetase 2
SePP	Selenoprotein P
T3	3,5,3'-Triiod-L-thyronin
T4	3,5,3',5'-Tetraiod-L-thyronin, L-Thyroxin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	engl. transfer RNA
tRNA ^{(Ser)Sec}	Selenocystein-spezifische tRNA
Txn	Thioredoxin
TxnRd	Thioredoxin-Reduktase
U	engl. Unit [nmol/min/mg]
UV/VIS	ultraviolette und sichtbares Licht
wt	Wildtyp

Chemische Elemente/Verbindungen, physikalische Größen/Einheiten bzw. Gene werden nach den in der Fachliteratur gebräuchlichen Normen abgekürzt.

Verzeichnis der verwendeten gebräuchlichen englischen Fachausdrücke:

Annealing	Binden des Primers (in der PCR)
Elongation	Synthese des komplementären DNA Strangs (in der PCR)
Vortex	vibrierendes Schütteln

Signifikanzen:

n.s. nicht signifikant

* $p < 0,1$

* $p < 0,05$

** $p < 0,001$

*** $p < 0,0001$

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung		I
Abstract		II
Abkürzungsverzeichnis		III
Inhaltsverzeichnis		VII
1	Einleitung	1
1.1	Chemische Eigenschaften des Selens	1
1.2	Biologische Bedeutung des Selens	1
1.3	Biosynthese von Selenoproteinen	3
1.4	Selenoproteine und Selenaufnahme	5
1.5	Selenoprotein P (SePP)	7
1.6	Selen und Krebs	9
1.7	Das Tumormodell APCmin	12
2	Zielsetzung	15
3	Material	16
3.1	Geräte	16
3.2	Software und Datenbanken	17
3.3	Chemikalien	18
3.3.1	Verbrauchsmaterialien	18
3.3.2	Oligonukleotide	18
4	Methoden	19
4.1	Zellkultur	19
4.2	Mauszucht und Genotypisierung	19
4.2.1	Zucht und Haltung	19
4.2.2	Isolierung genomischer DNA	20
4.2.3	Genotypisierung des APC/SePP Stammes	21

4.3	Darm- und Tumorpräparation	24
4.3.1	Darmpräparation für histologische Analysen	24
4.3.2	Tumorpräparation für Transkriptomanalyse	25
4.4	Histologische Methoden	26
4.5	Allgemeine molekularbiologische Methoden	26
4.5.1	Probenaufarbeitung und -aufbewahrung	26
4.5.2	RNA-Isolierung	26
4.5.3	Northern Blot	27
4.5.4	cDNA-Synthese	29
4.5.5	³² P-Sondenmarkierung	29
4.5.6	Amplifikation durch PCR	30
4.5.7	Real time-PCR	31
4.5.8	Transkriptionsanalyse mittels Microarray	32
4.5.9	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	33
4.5.10	Western Blot	35
4.5.11	Proteinhomogenat	36
4.5.12	Glutathionperoxidase -Aktivitätsbestimmung	37
4.5.13	Thioredoxinreduktase-Aktivitätsbestimmung	38
4.5.14	Messung proinflammatorischer Zytokine	40
4.6	Selenbestimmung	40
4.7	Statistische Auswertung	41
5	Ergebnisse	42
5.1.	SePP-Expression in Colonkarzinom-Zelllinien	42
5.2.	SePP- und GPx2-mRNA in Tumoren aus APCmin-Mäusen	44
5.3.	Charakterisierung der Tumore aus SePP x APCmin-Mäusen	46
5.3.1.	Versuchsaufbau	46
5.3.2.	Charakterisierung der Tumore	47
5.3.3.	Histopathologische Tumordiagnostik	53

5.4.	Genexpressionsvergleich von SePP ^{+/-} - und SePP ^{+/+} -Tumoren	55
5.4.1.	RNA-Microarray	55
5.4.2.	Validierung der Mircoarray-Daten mittels qRT-PCR	59
5.5.	Immunhistologie der Tumore in Abhängigkeit von SePP	73
5.6.	Expression selenabhängiger Enzyme im Darm - Einfluss durch SePP	74
5.6.1.	5.6.1 Selenkonzentration im Darmgewebe des Intestinaltrakts	74
5.6.2.	GPx-Aktivität im Darmgewebe	76
5.6.3.	TxnRd-Aktivität im Darmgewebe	77
6.	Diskussion	79
6.1.	Studien an Colonkarzinom-Zelllinien	79
6.2.	Tierexperimentelle Arbeiten	84
	Literaturverzeichnis	94
	Anhang	111
	Danksagung	116
	Veröffentlichungen	118
	Eidstattliche Erklärung	120

1 Einleitung

1.1 Chemische Eigenschaften des Selen

Das Halbmetall Selen (Se; Ordnungszahl: 34; Molekularmasse: 78,96 g/mol) reiht sich im Periodensystem der Elemente in die Gruppe der Chalkogene (VI. Hauptgruppe, bzw. 16. Gruppe nach IUPAC) ein. Seine chemischen Eigenschaften bedingen, dass es in der Natur kaum gediegen vorliegt. Aufgrund der chemischen Ähnlichkeit von Schwefel und Selen ist es zumeist Begleitmineral schwefelhaltiger Erze. So isolierte der schwedische Chemiker Jöns Jakob Freiherr von Berzelius das Element 1817 erstmals aus dem Anodenschlamm einer Schwefelsäurefabrik. In Anlehnung an den Namen eines weiteren Chalkogens, dem nur wenige Jahre zuvor entdeckten Element Tellur (Erdgottheit, lat. Tellus), wurde das silbergrau schimmernde Element nach der Mondgöttin (griech. Selene) benannt.

Selen kommt wie Schwefel in mehreren Modifikationen vor und findet sich in unterschiedlichen Oxidationsstufen. Im Mineral überwiegt das Selenid (Oxidationsstufe -II), nach Verbrennung entsteht an der Luft Selendioxyd (SeO_2 , Oxidationsstufe +IV), welches sich in Wasser zur selenigen Säure (H_2SeO_3) löst und zur Selensäure (H_2SeO_4 , Oxidationsstufe +VI) oxidiert werden kann. Generell ähnelt die chemische Reaktivität von Selen der des benachbarten Schwefels, allerdings ist die Oxidationsbereitschaft etwas geringer. Interessanterweise ändern einige Modifikationen des Selen ihre elektrische Leitfähigkeit durch externe Belichtung, zeigen also einen photovoltaischen Effekt, der in der Halbleiterindustrie breite Anwendung gefunden hat. In der Erdkruste zählt es mit ca. 1-10 ppm zu den eher seltenen Mineralien, vergleichbar in etwa dem Iod oder Silber. Jedoch unterscheiden sich verschiedene Regionen stark im Selengehalt des Bodens, was sich auf die dort angebauten landwirtschaftlichen Produkte auswirkt (Combs, 2001b). So wird der europäische Raum als nur schlecht versorgtes Gebiet angesehen, ein Umstand, dem bislang nur Finnland durch die Einführung einer systematischen Anreicherung von Selen im Mineräldünger Rechnung getragen hat (Combs, 2001b; Varo et al., 1988). Als potentielle Ursache werden sowohl der pH-Wert des Bodens als auch die durch die Eiszeit bedingten glazialen Erosionen diskutiert (Combs, 2001b).

1.2 Biologische Bedeutung des Selen

Das Spurenelement gelangt als anorganisches Selen (Selenat, Selenit, Selenid) über die Pflanzen in die Nahrungskette. Abhängig von der im Boden enthaltenen Selenkonzentration und vom pH-Wert variieren die durch Pflanzen aufgenommen Mengen erheblich (Combs, 2001b; Rayman, 2000). Neben Europa gelten auch der Osten und Norden Asiens als Selenmangelgebiete, was sich auf die Selengehalte der dortigen pflanzlichen Produkte und folglich auf die Nutztiere und Menschen auswirkt. Hingegen versorgen große Teile Nordamerikas ihre Bevölkerung mit suffizienten Selenmengen, da in den agrarintensiven Regionen selenreiche Böden vorherrschen (Combs, 2001b). Gebiete endemischer Selenüberversorgung sind in Teilen Chinas bekannt. Hier kann es im Zuge von Selenvergiftungen (Selenosen) bei den Bewohnern nach chronisch erhöhter Zufuhr zu Haarausfall und sich auflösenden Nägeln an Händen und Füßen kommen (Combs, 2001b). Ähnliche Symptome wurden bereits im 13. Jahrhundert von Marco Polo auf seiner Reise durch Asien bei seinen Lasttieren beschrieben. Auch aus der amerikanischen Geschichte sind solche Selenosen bekannt, hier häufig bei Kavallerie-Pferden, welche in extrem selenreichen Gegen-

den grasten und daraufhin Huferweichung, Haarausfall und Gewichtsverlust entwickelten (Ullrey, 1992). Heutzutage wird diesem Umstand weitgehend Rechnung getragen, und Selenosen werden zunehmend seltener. Allerdings gibt es immer wieder sporadische Fälle durch falsch kalkulierte Supplementation, Industrieunfälle oder versuchte Homi- oder Suizide (Hunsaker et al., 2005; Ruta and Haider, 1989; See et al., 2006; Spiller and Pfeifer, 2007). Eine aktuelle Studie verweist auf den Zusammenhang von jahrelanger Selen-Supplementation und erhöhtem Typ2-Diabetes-Risiko, allerdings ist dieser Befund noch nicht unabhängig verifiziert worden (Stranges et al., 2007).

Demgegenüber werden zu geringe Selen Spiegel mit einer Prädisposition für eine Reihe von Zivilisations- und Infektionskrankheiten in Verbindung gebracht (Rayman and Rayman, 2002). Für die Manifestation der endemisch auftretenden Krankheiten Kashin-Beck-Disease (eine degenerative Gelenkentzündung) und Keshan-Disease (eine Kardiomyopathie) wird eine geringe Selenzufuhr als kausale Voraussetzung angesehen (Köhrle et al., 2000). Hier könnte der Abhängigkeit des Immunsystems vom Selenstatus die entscheidende Rolle zukommen, aber die genauen molekularen Zusammenhänge sind noch nicht hinreichend bekannt.

Heute wissen wir, dass eine ausreichende Versorgung mit diesem Spurenelement für die menschliche Gesundheit von außerordentlicher Bedeutung ist. Selen stellt einen essentiellen Bestandteil der Ernährung dar, und es dient als potentiell hilfreiche Ergänzung in der Prävention und Therapie bestimmter Krankheiten. Die körperliche und geistige Entwicklung, die Gehirnfunktion, der Schilddrüsenhormonmetabolismus, das Herz-Kreislaufsystem, die männliche Fertilität und ein effektives Immunsystem sind direkt selenabhängig und zeigen Funktionsbeeinträchtigungen, wenn ein ausgeprägter Selenmangel vorliegt (Rayman, 2000). Entsprechend hat Selen eine außerordentliche Wandlung in der allgemeinen Wertschätzung vom Gift zum essentiellen Spurenelement mit gesundheitsfördernden Eigenschaften durchgemacht (Abbildung 1.1).

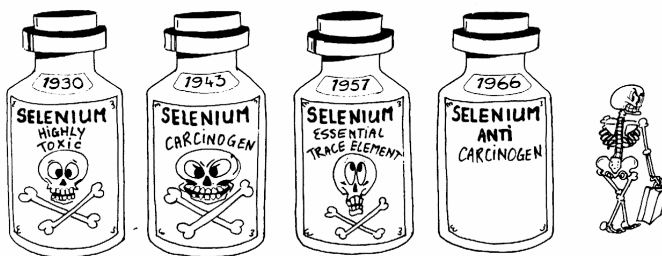


Abbildung 1.1: Cartoon zur sich verändernden Wertschätzung von Selen im Wandel der Zeit: Während Selen in den 30er und 40er Jahren durch seine Nähe zum Arsen überwiegend als potentiell toxisches Element wahrgenommen wurde, änderte sich das Bild mit der Identifizierung seiner Essentialität und Bedeutung als Selenoprotein schlagartig. Heutzutage überwiegt die Betrachtung von Selen als antioxidativem Nahrungssupplement und potentiell Chemopräventivum (Vernie, 1984).

Die nutritive und therapeutische Breite einer optimalen Selenversorgung ist eng gesteckt. Die empfohlene tägliche Aufnahme über die Nahrung beträgt ca. 70 $\mu\text{g Se/Tag}$ (Se/d) (Kohrl, et al., 2000). Bereits bei der zehnfachen Menge sind deutliche, aber offensichtlich weitgehend reversible, Vergiftungserscheinungen zu verzeichnen. Die LD_{50} von löslichen Selenverbindungen ist in ähnlichen Größenordnungen anzusetzen wie die seines Nachbarn im Perio-

densystem der Elemente, dem Arsen (Hughes, 2002). Dieses Wissen um das toxische Potenzial wurde erstmals in den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts beschrieben. Wenig später konnten auch karzinogene Eigenschaften bei Überdosierung nachgewiesen werden. Dieses negative Bild relativierte sich erst Ende der 50er Jahre. Schwarz und Foltz konnten durch Gabe verschiedener selenhaltiger Verbindungen (im ppm-Bereich) im Versuchstier eine Vitamin E-Mangel induzierte Lebernekrose verhindern (Schwarz and Foltz, 1958). Eine biologisch funktionelle Form des Selen wurde in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts beschrieben. Die Gruppe um L. Flohé konnte zeigen, dass Selen integraler Bestandteil der Glutathionperoxidase im höheren Säugetier ist (Flohé, et al., 1973). Diese Beschreibung bildete den Grundstein für die relativ neu identifizierte Proteinklasse der eukaryontischen Selenoproteine.

1.3 Biosynthese von Selenoproteinen

In der Natur sind drei Arten von selenhaltigen Proteinklassen bekannt, wobei zwischen einer spezifischen und nicht-spezifischen Seleninkorporation bzw. Selenbindung unterschieden wird.

Von „Selenoproteinen“ spricht man, wenn das Selen-Homolog einer schwefelhaltigen Aminosäure, also Selenomethionin (SeMet) bzw. Selenocystein (SeCys), anstelle von Methionin bzw. Cystein in die Proteinkette eingebaut wird. Im Fall von SeMet ist der Organismus nicht in der Lage zwischen der schwefel- und der selenhaltigen Aminosäure zu diskriminieren. Über diesen Mechanismus kann, abhängig vom relativen SeMet-Gehalt der Nahrung, eine theoretisch fast unbegrenzte Selenmenge im Körper akkumuliert werden, da prinzipiell jedes AUG-Kodon der mRNA zur SeMet-Insertion führen kann. In der Realität hat sich aber gezeigt, dass, z.B. im Falle des humanen Albumins, in einem gut versorgten US-Amerikaner nur ca. jedes 8000ste Methionin durch das Selen-Analogon ersetzt ist, und somit nur ca. jedes 1000ste Albumin selenhaltig ist (Burk, et al., 2001).

Eine physiologische Bedeutung konnte diesen unspezifisch SeMet-enthaltenden „Selenoproteinen“ nicht zugewiesen werden. Doch ist es denkbar, dass sie zu einem gewissen Grade der unspezifischen Selenspeicherung oder der Schwermetall-detoxifizierung dienen. Diese Proteine könnten aber auch an der oben beschriebenen Selenotoxizität beteiligt sein.

Neben diesen Proteinen, in denen die selenhaltige Aminosäure einen konstitutiven Bestandteil der Peptidkette darstellt, gibt es eine kleine Gruppe von Proteinen, bei denen eine reversible Bindung von Selen beschrieben ist. Das molekulare Wissen über diese selenbindenden Proteine ist aber noch sehr beschränkt. Bisher sind drei Vertreter dieser Proteinklasse bekannt (Selenbp1 [56 kDa] (Bansal, et al., 1990; Chang, et al., 1997), Selenbp2 [56 kDa] (Lanfear, et al., 1993), FABP1 [14 kDa] (Bansal, et al., 1989), wobei über deren physiologische Funktionen, gerade im Hinblick auf den Selenmetabolismus und die selenabhängigen Reaktionen zurzeit nur spekuliert werden kann. Interessanterweise sind aber zumindest die mRNA-Transkripte dieser Proteine in bestimmten Pathologien bzw. *in vitro* Stimulationsversuchen stark reguliert, so dass eine spezifische biologische Funktion nicht unwahrscheinlich ist.

Die eigentliche Gruppe der „echten Selenoproteine“ ist ebenfalls sehr überschaubar und wird im Menschen von nur 25 Genen kodiert (Kryukov, et al., 2003). Bei diesen Proteinen wird die 21. proteinogene Aminosäure SeCys gezielt, d.h. an spezifischen Positionen, in die wachsende Peptidkette eingebaut. Dieser Mechanismus stellt eine Erweiterung des klassischen genetischen Kods und der Translation dar, da das Triplet UGA im Genom gewöhnlich die Termination der Translation markiert (sog. Opal-Stopp-Kodon). Im Falle der Selenoproteine kodiert dieses Triplet für den SeCys-Einbau und wird somit während der Translation uminterpretiert. Die molekularen Details dieser „Uminterpretation“ des UGA-Kodons wurden zunächst in Prokaryonten durch die Arbeitsgruppe um A. Böck aufgeklärt (Bock, et al., 1991; ; Zinoni, et al., 1990). Später zeigte sich, dass Eukaryonten einen analogen Mechanismus verwenden, der sich aber in wichtigen Details vom bakteriellen Modus unterscheidet. Generell liegt die Information für die Dekodierung des UGA-Kodons zur SeCys-Insertion als mRNA-Strukturmotiv bei Prokaryonten direkt benachbart zum UGA-Kodon innerhalb des Leserasters und bei Eukaryonten im 3'-untranslatierten Bereich der mRNA. Hier bildet sich jeweils bei den Transkripten, die für Selenoproteine kodieren, eine charakteristische Sekundärstruktur aus, das sog. SECIS-Element (SECIS: SeCys Insertions-Signal) (Krol, 2002; ; Papp, et al., 2007; ; Thanbichler and Bock, 2002). Während der Translation wird dieses RNA-Motiv von einem RNA-bindenden Protein erkannt. Im Prokaryonten wird dieses Protein SelB genannt (Thanbichler and Bock, 2002), im Eukaryonten heißt es SECIS-bindendes Protein 2 (SBP2) (Krol, 2002). Dieser Faktor bindet im Eukaryonten über eine Protein-Protein-Interaktion den SeCys-spezifischen Elongationsfaktor (EFSec), welcher die mit SeCys-beladene $tRNA^{Ser(SeC)}$ und ein GTP gebunden hat. Im Prokaryonten sind beide Funktionen im SelB vereinigt, also sowohl die SBP2-analoge SECIS-Erkennung und -Bindung als auch die Assoziation mit GTP und der beladenen $tRNA^{Ser(SeC)}$. Durch die Bindung dieses Komplexes an das Ribosom kann im Eukaryonten das ribosomale Protein L30 über eine Konformationsänderung mit dem SECIS-Element interagieren, wobei SBP2 dissoziiert, die $tRNA^{Ser(SeC)}$ freigesetzt wird und SeCys in die wachsende Peptidkette eingebaut werden kann (Chavatte, et al., 2005; ; Papp, et al., 2007).

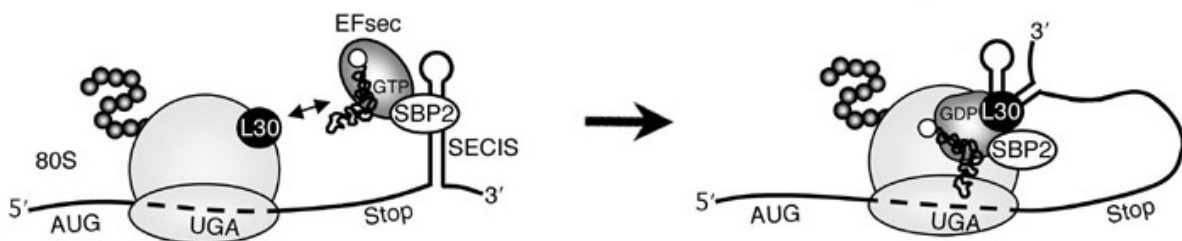


Abbildung 1.2: Modell der eukaryontischen UGA-Rekodierung: Eine Haarnadelstruktur im 3'-untranslatierten Bereich der mRNA (SECIS) bedingt, dass UGA nicht als Termination gelesen wird, sondern als Triplet für den Einbau von SeCys dient. Hierzu bindet im Eukaryonten SBP2 an das SECIS-Element, was die Rekrutierung des Translationsfaktors EFsec und der SeCys-beladenen $tRNA^{Ser(SeC)}$ nach sich zieht. Durch Assoziation an das Ribosom kommt es zum Austausch des SECIS-bindenden SBP2 gegen das ribosomale Protein L30. Eine Konformationsänderung des SECIS ist die Folge. Die $tRNA^{Ser(SeC)}$ kann dissoziieren, SeCys wird eingebaut und GTP wird hydrolysiert (Chavatte et al., 2005).

Durch Recycling kann die freigesetzte tRNA^{Ser(Sec)} erneut der Selenoprotein-Biosynthese zugeführt werden. Hierbei wird im Gegensatz zu den anderen 20 Aminosäuren die tRNA^{Ser(Sec)} nicht direkt mit SeCys beladen, sondern zunächst durch die Seryl-tRNA-Synthetase mit Serin verknüpft (Papp, et al., 2007). In weiteren enzymkatalysierten Schritten wird der Serylrest zu SeCys umgebaut. Das hierzu nötige Selenophosphat wurde unter ATP-Verbrauch aus Selenid durch die Selenophosphat-Synthetase 2 (SPS2) generiert (Papp, et al., 2007). Interessanterweise stellt dieses zentrale Enzym ebenfalls ein Selenoprotein dar, und könnte somit eine wichtige Rolle im Feedback zwischen Selenoprotein-Biosynthese und Selenverfügbarkeit spielen. In einem anschließenden Schritt kann das Selenol (die SeH-Gruppe) durch die Selenocystein-Synthase (SLA/SecS) auf die tRNA^{Ser(Sec)} übertragen werden (Papp, et al., 2007). Hiermit schließt sich der Kreis und die so generierte SeCys-beladene tRNA^{Ser(Sec)} steht erneut zur Biosynthese des nächsten Selenoproteins bereit.

Im Gegensatz zum SeMet, welches analog zu Methionin unverändert wieder verwendet oder über eine Transsulfurierung verstoffwechselt werden kann, folgt SeCys nicht dem Stoffwechsel des Schwefelhomologs Cystein. Dies bedeutet, dass bei SeCys kein direktes Recycling stattfindet, da es nicht über eine Aminoacyl-Transferase auf die tRNA^{Ser(Sec)} geladen wird. Stattdessen wird SeCys durch ein SeCys-spezifisches Enzym (L-Selenocystein β -Lyase) zu Selenwasserstoff und L-Alanin gespalten und dann wie diätetisch aufgenommenes Selen durch SPS2 und ATP reaktiviert, ehe es die Hydroxylgruppe einer Seryl-beladenen tRNA^{Ser(Sec)} durch die charakteristische Selenol-Gruppierung ersetzen kann (Papp, et al., 2007).

1.4 Selenoproteine und Selenaufnahme

Die Stoffklasse der Selenoproteine erstreckt sich von niederen bis zu den höheren Lebensformen. Generell ist zu konstatieren, dass das Selenoproteom innerhalb der verschiedenen Spezies relativ klein ist. Die größte Vielfalt an Selenoproteinen sind im Fisch anzutreffen (30 Selenoproteine), gefolgt vom Menschen (25 Selenoproteine) und der Maus (24 Selenoproteine) (Papp, et al., 2007). Die tendenziell geringere Zahl an Selenoproteinen in niederen Organismen, wie z.B. den Nematoden (*Caenorhabditis elegans*, 1 Selenoprotein) oder der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*, 3 Selenoproteine), ist vermutlich auf evolutionär verspätete Entwicklung von SeCys als proteinogene Aminosäure sowie auf Limitierung des Spurenelements und auf zunehmende Komplexität der Aufgaben in höheren Säugern zurückzuführen.

Die Besonderheit und wahrscheinlich die evolutionäre Neuerung der Selenoproteine stellt das Redoxpotential dar. SeCys liegt unter physiologischen Bedingungen deprotoniert vor und hat folglich auch eine weitaus höhere Reaktivität als sein Analogon, das Cystein (Axley, et al., 1991; ; Gasdaska, et al., 1999; ; Lee, et al., 2000) (Berry, et al., 1992; ; Kuiper, et al., 2003; ; Schomburg, et al., 2004; ; Stadtman, 1996).

Die Eigenschaften und die Bedeutung von vielen Selenoproteinen ist derzeit noch nicht ausreichend charakterisiert (Schomburg, et al., 2004). Einzelne Selenoproteine konnten jedoch bereits funktionell gut beschrieben werden, und drei selenabhängige Enzymfamilien sind etabliert (Gromer, et al., 2005).

Hierzu gehört die fünf Mitglieder umfassende Familie der selenabhängigen Glutathionperoxidasen (GPx) (Kryukov, et al., 2003). Die einzelnen GPx unterscheiden sich durch ihre Substratspezifität, den Expressionsort und die Regulation der Expression. Überdies werden sie bei Selenmangel unterschiedlich gut mit dem essentiellen Spurenelement versorgt (Gromer, et al., 2005; ; Wingler, et al., 1999). So stellt die GPx4 das am stabilsten exprimierte und versorgte Isoenzym dar, welches Phospholipidhydroperoxide als Substrate bevorzugt und sich im transgenen Tier als essenziell erwiesen hat (Brigelius-Flohe, 2006). Die ubiquitär exprimierte GPx1 bevorzugt kleine hydrophile Peroxide als Substrate und reagiert sehr empfindlich auf den Selenstatus, ist insofern also niedrig in der Selenhierarchie anzuordnen (Brigelius-Flohe, 1999; ; Chu, et al., 2004). Eine ins Blut sezernierte Form, die GPx3, entstammt hauptsächlich der Niere und kann als Selenmarker im Serum herangezogen werden (Burk, et al., 2006). Neben der nur rudimentär beschriebenen GPx6 (Kryukov, et al., 2003) gibt es noch die gastrointestinal exprimierte GPx2, für welche eine Schutzfunktion der Epithelien im Darm gegen die reaktiven Nahrungsbestandteile angenommen wird (Chu, et al., 2004). Ihre Bedeutung für die Tumorigenese im Darm ist noch nicht herausgearbeitet, wobei jedoch eine spezifische Induktion der mRNA von GPx2 beschrieben ist (Al-Taie, et al., 2004; ; Mork, et al., 2000).

Neben den GPx ist die Familie der Thioredoxin-Reduktasen (TxnRd) gut charakterisiert (Nordberg and Arner, 2001; ; Powis and Montfort, 2001; ; Rundlof and Arner, 2004). Hier sind drei Isoenzyme bekannt, von denen sich TxnRd1 und TxnRd2 ebenfalls als essenziell erwiesen haben (Bondareva, et al., 2007; ; Conrad, et al., 2004; ; Jakupoglu, et al., 2005). Diese Selenoproteine sind an der Kontrolle des intrazellulären Redoxstatus beteiligt, regulieren dadurch die Aktivität redox-kontrollierter Transkriptionsfaktoren und üben somit einen umfassenden Einfluss auf das Genexpressionsmuster aus. Überdies ist die Aktivität der TxnRd von großer Bedeutung bei der Biosynthese der Desoxynukleotide als Bausteine der DNA bei der Replikation.

Die Familie der Iod-Thyronin-Deiodasen (Dio) umfasst drei Mitglieder (Kohrle, 2000) (Bianco and Kim, 2006). Während die 5'-Dio2 eine Aktivierung des von der Schilddrüse sekretierten Prohormons 3,3',5,5'-Tetraiodothyronin (Thyroxin, T4) zum biologisch aktiven 3,3',5-Triiodothyronin (T3) katalysiert, beschleunigt die 5-Dio3 die Inaktivierung von T4 bzw. T3 zu reversT3 (rT3) bzw. T2. Das in Leber und Niere stark exprimierte Isoenzym 5'-Dio1 vermag sowohl die 5'-als auch die 5-Deiodierung zu katalysieren und kann damit eine Aktivierung von T4 oder die Inaktivierung von T4 und T3 katalysieren. Die biologische Rolle, die dieses Enzym im Schilddrüsenhormonstoffwechsel spielt, ist somit komplex und noch nicht voll verstanden. Die kürzlich beschriebene Inaktivierung des 5'-Dio1-Gens in der Maus deutet auf einen wichtigen Beitrag für die Iod-Homöostase und den Iodothyronin-Abbau hin (Schneider, et al., 2006).

Als Einzelvertreter sind die Selenophosphat-Synthetase 2 (SPS2) und die Methionin-Sulfoxid-Reduktase B (MsrB) gut charakterisiert. SPS2 katalysiert die bereits beschriebene Aktivierung von Seleniden zu Selenophosphat und stellt damit einen potentiellen Kontrollpunkt in der Feedback-Regulation der Selenoprotein-Biosynthese dar. MsrB vermag oxidierte Methionyl-Reste in Proteinen wieder zu reduzieren und wirkt damit der Protein-Alterung entgegen bzw. kann bei einem potentiell reversiblen Methionin-Sulfoxid-Signalweg regulierend eingreifen

Über eine Reihe von Selenoproteinen (15kDa, H, I, K, M, N, O, P, R, S, T, V und W) ist bislang äußerst wenig bekannt. Das im Folgenden beschriebene Selenoprotein mit dem höchsten Selengehalt ist hingegen zunehmend intensiv studiert und analysiert worden.

1.5 Selenoprotein P (SePP)

Unter den Selenoproteinen stellt SePP eine Besonderheit dar. Bei den anderen Selenoproteinen formt die mRNA-Sequenz nur ein distinktes SECIS-Element zur Dekodierung des singulären UGA-Kodons aus. Die SePP-mRNA hingegen weist als einziges Transkript multiple Selenocystein-spezifische UGA-Kodons im Leseraster auf und zeichnet sich überdies durch zwei unterschiedliche SECIS-Elemente aus. Diese Kombination scheint nötig, um den effektiven Einbau von vielen SeCys-Resten in ein einziges Polypeptid (10 Sec-Resten im Falle des humanen SePP) sicherzustellen. Mit dem Vorhandensein multipler SeCys-Reste setzt sich die Extraordinarität des SePP unter den Selenoproteinen fort. Aufgrund dieser hohen Anzahl von SeCys-Resten wurde schon frühzeitig eine Rolle von SePP als Transportprotein im Plasma postuliert.

Die Primärstruktur unterteilt sich in verschiedene Bereiche: ein N-terminales Signalpeptid, einen einzelstehenden zentralen SeCys-Rest mit zwei benachbarten histidinreichen Abschnitten und eine C-terminale Domäne, in der sich die restlichen neun SeCys-Reste befinden. Die Differenz von theoretischen 41,1 kDa zu gemessenen 47-54 kDa ist in einer umfassenden Glycosylierung des Proteins begründet.



Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Selenoprotein P (SePP): SePP stellt ein sezerniertes Plasmaprotein (SignP, Signalpeptid) dar, welches 10 Selenatome in Form der 21. Aminosäure SeCys trägt und insofern als Selen-transport- und speicherprotein angesehen werden kann. Ein einzelner SeCys-Rest (SeCys1) befindet sich in der N-terminalen Hälfte in der Nähe zweier histidinreicher Abschnitte (His-rich) und könnte bei der Katalyse selenabhängiger Reaktionen beteiligt sein. Die restlichen 9 SeCys-Reste sind C-terminal und dienen überwiegend bzw. ausschließlich dem Selentransport.

SePP ist ein extrazelluläres Protein, welches in fast allen Geweben gebildet wird. Als Hauptbildungsort von SePP für die Zirkulation konnte die Leber identifiziert werden (Burk and Hill, 2005), von der es in die Blutbahn sezerniert wird. Es macht unter normalen Bedingungen ca. 50% des Serumselens aus. Die physiologische Rolle im Selentransport, in der hepatisch gebildetes SePP eine Art von Selenverteiler für alle weiteren Organe ist, wurde durch Knock-out (KO)-Modelle unterstützt (Burk and Hill, 2005; ; Schweizer and Schomburg, 2005; ; Schweizer, et al., 2005). Weitergehende Studien lassen auch eine Selenspeicherfunktion vermuten (Schomburg, et al., 2004).

Das einzelstehende SeCys an Position AS40 (humanes SePP) kann unter *in vitro*-Bedingungen ähnlich den GPx-Isoenzymen Redoxreaktionen katalysieren (Arteel, et al., 1998; ; Takebe, et al., 2002). Eine andere potentielle Funktion ist in der Bindung von Schwermetallen wie Quecksilber, Cadmium und Zink an die histidinreichen Bereiche postuliert worden (Suzuki, et al., 1998; ; Yan and Barrett, 1998).

SePP stellt somit ein Multifunktionsprotein dar, welches sowohl für die Selenverteilung/-speicherung im Organismus verantwortlich ist, als auch einen extrazellulär-antioxidativen Schutz bietet und Schwermetalle binden kann.

SePP-Maus: Durch die Deletion des SePP-Gens in der Maus konnte die physiologische Funktion und eine essen-
tielle Bedeutung von SePP erkannt und biochemisch charakterisiert werden (Hill, et al., 2003; Schomburg, et al.,
2003).

Wie bereits erwähnt, ist der Hauptbildungsort von SePP die Leber. Von hier aus gelangt das über den Darm aufge-
nommene Selen durch die SePP-Biosynthese und -Sekretion über die Blutbahn zu den anderen SePP-
abhängigen Organen des Körpers. Diese Transport-Hypothese wird durch die Analyse der Selenspiegel verschie-
dener Organe in der SePP^{-/-}-Maus untermauert. So fällt der Selengehalt in den der Leber „nachgeschalteten“ Orga-
nen Niere, Hoden oder Gehirn in den SePP^{-/-}-Tieren deutlich ab. Hingegen reichert sich parallel das über die Nah-
rung aufgenommene Selen durch die fehlende SePP-Biosynthese und -Abgabe in der Leber an. Die Aktivitäten der
GPx1 folgen dieser veränderten Selenverteilung in der SePP^{-/-}-Maus und zeigen ein ähnliches Muster (Schomburg,
et al., 2003).

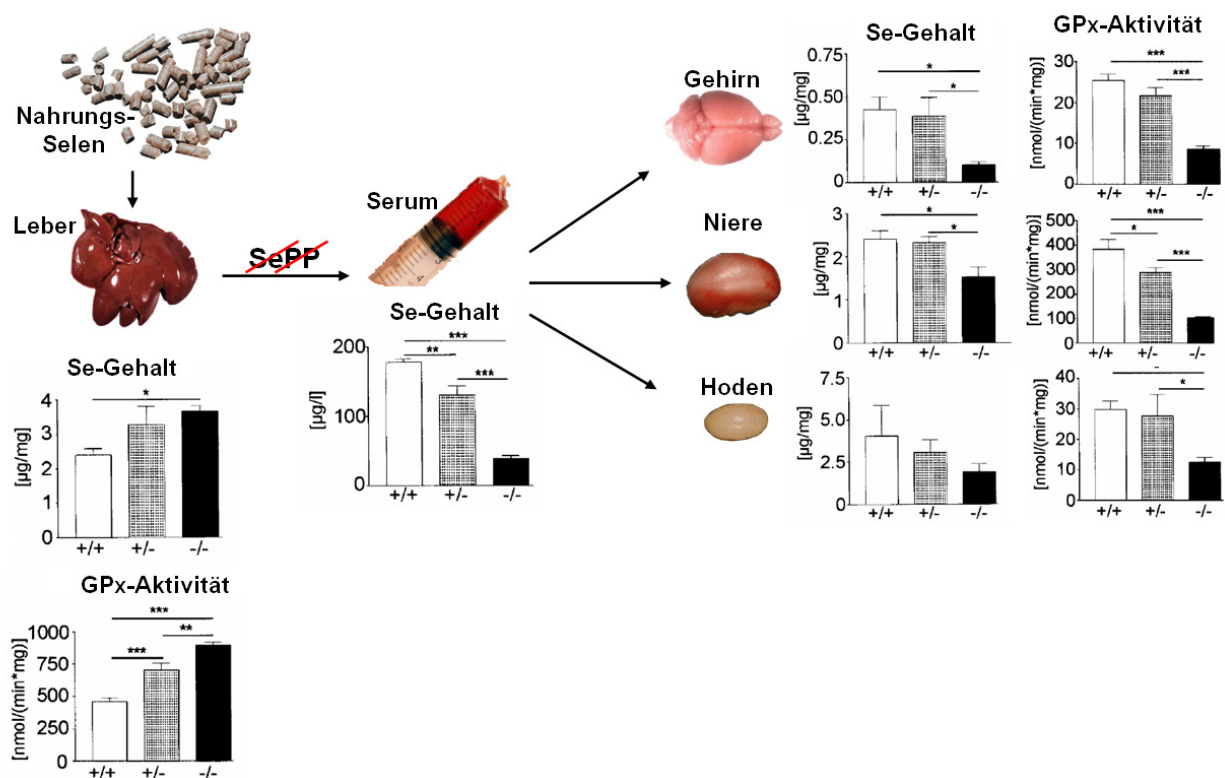


Abbildung 1.4: Veränderungen im Selenstatus in SePP-Mäusen: Während durch die fehlende SePP-Biosynthese die Leber zunehmend das über die Nahrung aufgenommene Selen akkumuliert, verarmen die auf den SePP-Transport angewiesenen Organe wie Plasma Niere, Gehirn oder Hoden zunehmend an Selen (Se-Gehalt) und zeigen entsprechend reduzierte Aktivitäten der selenresponsiven Glutathionperoxidase (GPx-Aktivität) (in Abwandlung (Schomburg, et al., 2003)).

Auch der gesundheitliche Phänotyp nach Deletion des murinen SePP-Gens ist dramatisch. Die Mäuse zeigen eine gestörte Motorkoordination, leiden an spastischen epileptischen Anfällen als Folge des drastischen Selen-Abfalls

im Gehirn und versterben mitunter unvermittelt im Alter von 30 bis 40 Tagen (Schomburg, et al., 2003). Die männlichen Tiere sind infertil, was auch nicht durch zusätzliche Selen-Supplementation behoben werden kann (Renko, et al., 2008). Nach dem Absetzen vom Muttertier wird nicht der sonst übliche Wachstumsschub vollführt, so dass die Tiere im Vergleich zu ihren Wurfgenossen lediglich ein 50% geringeres Gewicht erreichen.

Die heterozygoten Mäuse sind hingegen phänotypisch weitgehend unauffällig. Sie wachsen vergleichbar zu den Wildtyp-Mäusen, sind fertil und zeigen keine Anzeichen von eingeschränkter Fitness, Koordinationsverlust oder verringerter Lebenserwartung. In der Spurenelementanalyse lassen die Tiere jedoch in ihrer Selenverteilung einen intermediären Phänotyp zwischen $\text{SePP}^{-/-}$ und Wildtyp-Kontrolltieren erkennen, so dass man vereinfacht von drei charakteristischen Maus-Gruppen für die folgenden Experimente ausgehen kann: Tiere mit gutem ($\text{SePP}^{+/+}$), mäßigem ($\text{SePP}^{+/-}$) und mit schlechtem ($\text{SePP}^{-/-}$) Selenmetabolismus, die auch entsprechend in den SePP-abhängigen Organen einen guten ($\text{SePP}^{+/+}$), mäßigen ($\text{SePP}^{+/-}$) und geringen ($\text{SePP}^{-/-}$) Selenstatus aufweisen.

SePP im Menschen: Patienten mit einem Gendefekt in SePP konnten bislang noch nicht identifiziert werden. Hingegen wurden Polymorphismen im Promotorbereich des humanen SePP-Gens beschrieben, die zu individuell unterschiedlich starker Expression von SePP und damit bei vergleichbarer Ernährungslage zu stark unterschiedlichen Selenkonzentrationen im Körper führen können (Al-Taie, et al., 2002; ; Meplan, et al., 2007). In Mäusen führt ein kompletter Verlust der SePP-Expression zu drastischen Phänotypen mit Wachstumsdefekt, Ataxien und epileptischen Anfällen, so dass man vermuten kann, dass entsprechende Menschen ohne SePP-Expression nicht lebensfähig sind. Heterozygote Mäuse sind hingegen gesundheitlich unauffällig und könnten als geeignetes Modell dienen, um die Folgen eines für den Menschen relevanten partiellen SePP-Verlusts zu analysieren. Solch ein Defizit kann durch eine unzureichende Ernährungslage, durch eine Erkrankung oder durch einen Gendefekt in einem SePP-Allel oder einer Komponente der Selenoprotein-Biosynthesemaschinerie entstehen. Im Falle des SECIS binding protein 2 (SBP2) wurde eine Mutation beschrieben, welche in den Patienten zu einer reduzierten SePP-Konzentration im Blut und einer gestörten Schilddrüsenhormonachse führt (Dumitrescu, et al., 2005). Über die Auswirkungen auf die Motorkoordination, Fertilität oder Krebsprädisposition ist leider noch nichts bekannt. Da es aber klinische Daten aus Darmbiopsien gibt, die einen Verlust des SePP-Genes in intestinalen Tumoren zeigen (Al-Taie, et al., 2004; ; Mork, et al., 2000), stellt sich die Frage nach der Bedeutung einer verringerten oder fehlenden SePP-Expression für die Entwicklung intestinaler Tumore.

1.6 Selen und Krebs

Epidemiologische Studien legen eine inverse Korrelation zwischen der Selenversorgung und einer erhöhten Frequenz neoplastischer Veränderungen in verschiedenen Geweben nahe (Vernie, 1984).

Erste Assoziationen dieser inversen Korrelation entstanden bereits in den 30er und 40er Jahren des 20. Jahrhunderts im Zuge von experimentellen Studien, die eigentlich die prokarzinogenen Eigenschaften des Spurenelements unterstreichen sollten (Vernie, 1984). Shamberger und Frost äußerten die Vermutung eines Zusammenhangs zwischen Erhöhung der allgemeinen Mortalität bzw. Krebssterblichkeit und des Selenstatus. Hierzu wurde die Selenmenge in Agrarprodukten, als auch der Selengehalt von Serumproben in verschiedenen Regionen Nordamerikas (Shamberger and Frost, 1969) bestimmt. Weitere epidemiologische Studien in verschiedenen Regionen der Welt

konnten diesen Verdacht erhärten (Schrauzer, et al., 1977). Als selenresponsiv zeigten sich vor allem Krebsarten der Lunge, des Intestinaltrakts, der Prostata, der Brust, des Ovars, sowie Leukämie (Combs and Gray, 1998; Rayman, 2005; Vernie, 1984).

Eine Verringerung der Krebsinzidenz bzw. krebsassoziierten Sterblichkeit von Leber- wie auch Magenkrebs wurde durch Verabreichung größerer Selenmengen in drei unabhängigen Interventionsstudien in China beobachtet (Combs and Gray, 1998).

Als Meilenstein gilt heutzutage die prospektive, doppel-blind, plazebokontrollierte Studie des Nutritional Prevention of Cancer Trial (NPC-Taril), auch als Clark-Studie bezeichnet. Hierbei erhielten 1312 Patienten über einen mittleren Zeitraum von 4,5 Jahren eine tägliche Selen-Supplementation von 200 µg Se/Tag in Form von selenangereicherter Hefe. Überraschenderweise zeigte sich keine positive Auswirkung auf das primäre Studienziel, die Hautkrebsrezidivrate, doch die Inzidenz anderer Tumorarten (Darm-, Prostata- und Lungenkrebs) wie auch die krebsassoziierte Sterblichkeit war signifikant in den selensupplementierten Probanden reduziert (Combs, 2001). Der präventive Einfluss der Selen-Supplementation war besonders deutlich in der Teilgruppe von Patienten, die initial mit durchschnittlichen bis eher geringeren Plasmaselen-Konzentrationen in die Studie eintraten (siehe Abbildung 1.4).

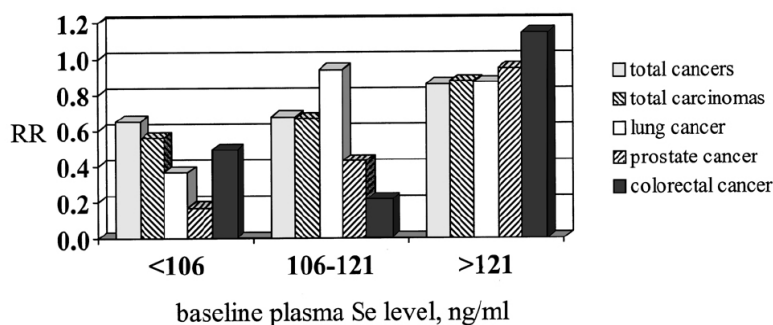


Abbildung 1.5: Relatives Krebsrisiko (RR) einer prospektiven Selen-Supplementationsstudie (Clark, et al., 1996): Über 1.300 Probanden erhielten täglich eine Selen-Supplementation (200 µg Se) oder ein Placebo. Das Tertil mit dem initial geringsten Selen-Spiegel profitierte am meisten von einer Supplementation mit einer deutlichen Verringerung des Risikos für Lungen-, Prostata- oder Darmkrebs (Combs, 2001).

Bei der Nachverfolgung dieser Studie bestätigten sich die chemopräventiven Effekte auf die gesamte Krebsinzidenz bzw. krebsassoziierte Sterblichkeit, wie auch die Prostatakrebsrate. Die Häufigkeiten für Lungen- wie auch Darm-Tumore zeigten sich tendenziell aber nicht mehr statistisch signifikant erniedrigt (Duffield-Lillico, et al., 2002). Anzumerken ist, dass hierbei eine Aufteilung der einzelnen Krebsarten in Tertile nicht aufgeführt wurde.

Eine Zusammenfassung mehrerer Studien mittels Metaanalyse zeigte im Falle von Lungenkrebs (Zhuo, et al., 2004), Prostatakrebs (Etminan, et al., 2005), wie auch intestinaler Tumorbildung (Bjelakovic, et al., 2006; Bjelakovic, et al., 2004; Jacobs, et al., 2004) einen signifikant präventiven Effekt von Selen. Die Verminderung des Krebsrisikos lag je nach Tumorart zwischen 25% und 50%. In der Tat erschien Selen, verglichen mit anderen Anti-

oxidantien, in der Nahrung den konsistentesten krebspräventiven Effekt auszuüben (Bjelakovic, et al., 2006: ; Bjelakovic, et al., 2004).

Generell deutet vieles darauf hin, dass Männer deutlicher von einer Selen-Supplementation profitieren als Frauen (Riese, et al., 2006: ; Waters, et al., 2004). Der Untersuchung dieser Genderunterschiede wird leider in einer der größten Supplementationsstudien, die derzeit in den USA durchführt wird, nicht Rechnung getragen. Hierbei erhalten 32.400 Probanden täglich eine Supplementation mit entweder Selen, Vitamin E, Selen und Vitamin E oder Placebo über einen Zeitraum von fünf bis zwölf Jahren (Klein, et al., 2000). Diese prospektive Doppelblindstudie mit Namen SELECT (Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trail) hat als primäres Ziel die Prävention des Prostatakarzinoms, doch werden auch deutliche Effekte auf Krebserkrankungen anderer Organe erwartet. Eine ähnlich große Studie von europäischer Seite (PRECISE: Prevention of Cancer by Intervention with Selenium) mit ca. 33.000 Personen wurde leider abgesagt (Rayman, 2005). Dies ist besonders bedauerlich, da doch die tägliche Selenzufuhr in Europa gegenüber den USA deutlich geringer ist, wodurch sich etwaige positive Effekte des Selens als leichter erkennbar und stärker ausgeprägt erweisen sollten.

Die molekularen Mechanismen der chemopräventiven Wirkung von Selen bzw. Selen-Supplementationen sind noch weitgehend ungeklärt. Generell kann man die Diskussion zum einen in eine pharmakologische Wirkung, vermittelt durch niedermolekulare Selenverbindungen, und zum anderen eine direkte Wirkung von spezifischen Selenoproteinen unterteilen.

Selenhaltige Stoffwechselprodukte bzw. synthetische Organo-Selenverbindungen, hier vor allem monomethylierte Selen-Derivate, sollen einerseits inhibierend auf Zellzyklus und -proliferation, andererseits aktivierend auf Apoptose und das Immunsystem wirken (Ip, et al., 2002: ; Whanger, 2004). Hierbei kann allerdings die Responsivität verschiedener Organe unterschiedlich ausfallen (Irons, et al., 2006).

Einzelne Selenoproteine wurden auch durch SNP-Analysen (Single Nucleotide Polymorphism), sowie durch transgene Mausmodelle und Expressionsstudien mit einer erhöhten Tumorigenesis bzw. Krebswachstum-fördernden Prozessen korreliert (Al-Taie, et al., 2002: ; Diwadkar-Navsariwala and Diamond, 2004: ; Esworthy, et al., 2001: ; Irons, et al., 2006). Hierbei hatten nicht alle Selenoproteine eine präventive Wirkung auf die Tumorentwicklung (Diwadkar-Navsariwala, et al., 2006: ; Yoo, et al., 2007), wodurch die zum Teil recht unterschiedlichen Effekte in einzelnen Studien erklärt werden könnten. Ein Konsens über die Bedeutung von Selenoproteinen oder kleinen organischen Selen-Metaboliten für die chemopräventive Wirkung ist noch nicht erreicht.

Neben den epidemiologischen und Interventionsstudien wurde auch eine Reihe von tierexperimentellen Studien durchgeführt. Combs schätzte bereits Ende der 90er Jahre des 20. Jahrhunderts die Anzahl auf über 100 Studien (Combs and Gray, 1998). Hierbei untermauerten 2/3 aller Studien einen präventiven Effekt des Spurenelements. Hingegen wurde nur in drei Fällen ein negativer Effekt von Selen nachgewiesen (Combs and Gray, 1998).

Derzeit sind knapp über fünfzig Studien veröffentlicht, welche sich mit dem Einfluss von Selen auf die intestinale Neoplasie beschäftigen (eigene Recherche der Datenbank des National Center for Biotechnology Information, NCBI). Hierbei wurden Synonyme der Begriffe Intestinaltrakt, Tumor-/Modell in verschiedenen Kombinationen verwendet. Nur in den seltensten Fällen wurde dabei auf genetisch induzierte Tumormodelle, wie die APCmin-Maus, zurückgegriffen.

1.7 Das Tumormodell APC^{min}

Die APC^{Min/+}-Maus ist ein etabliertes *in vivo*-Modell zur Analyse von Darmkrebs (Clarke, 2007: ; de Lau, et al., 2007: ; Moser, et al., 1995: ; Moser, et al., 1990: ; You, et al., 2006). Die Tiere sind das Produkt eines systematischen Mutagenese-Screenings, in welchem den Mäusen 1-Ethyl-1-Nitrosoharnstoff verabreicht wurde (Moser, et al., 1990). Hierbei können durch Basenaustausch einzelne Punktmutationen induziert und über die Keimzellen an die Nachkommen weitergegeben werden. Der Phänotyp der multiplen intestinalen Neoplasie (min) kann auf eine Nonsense-Mutation im APC-Gen zurückgeführt werden. Eine ähnliche Krankheit ist auch im Menschen bekannt. Hierbei entwickeln Patienten durch den Verlust eines Allels (loss of heterozygosity, LOH) des Tumorsuppressors APC multiple Adenome im Darm (Levy, et al., 1994), welche sich zum Adenokarzinom weiterentwickeln können. Hier wird die erbliche Form dieser Erkrankung FAP (Familiäre adenomatöse Polyposis) genannt (Friedrich and Kullmann, 2003: ; Galiatsatos and Foulkes, 2006: ; Rustgi, 2007). Patienten mit unbehandelter FAP entwickeln nahezu ausnahmslos kolorektale Karzinome. Ebenso sind in den APC^{min}-Mäusen bei einhundert Prozent der heterozygoten Tiere (C57/Bl/6 Hintergrund) spontane multiple intestinale neoplastische Veränderungen zu beobachten, wobei homozygote Tiere – vermutlich ebenso wie homozygote FAP-Patienten – nicht lebensfähig sind.

Die Tumorigenese ist Folge einer Dysregulation im Wnt/ β -Catenin-Signalweg. Dieser steuert u.a. die Zellteilung adulter Stammzellen im unteren Teil der Darmkrypten und ist somit für die stetige Erneuerung der intestinalen Epithelschicht verantwortlich. Hier spielt die intrazelluläre Konzentration des Cadherin-bindenden β -Catenins eine zentrale Rolle.

In adultem epithelialem Gewebe wird das stetig von der Zelle gebildete β -Catenin durch einen Multiproteinkomplex (β -Catenin destruction complex), bestehend aus APC, Axin, Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) und Casein kinase 1 α (CK1 α), zum Abbau vorbereitet (siehe Abbildung 1.6). Hierzu bindet β -Catenin an APC und Axin, so dass es durch die Kinase CK1 α am Serin 45 (S45) phosphoryliert werden kann. GSK3 β vermittelt weitere Phosphorylierungen an Threonin und Serin n-terminal zu S45, wodurch das phosphorylierte β -Catenin durch β -Transducing repeat-containing protein (β -TRCP) ubiquitiniert werden kann, um letztlich vom Proteasom abgebaut zu werden (Gregorieff and Clevers, 2005). Dieser stetige Abbau von β -Catenin kann durch Wnt-vermittelte Bindung an den Fzd/LRP-Rezeptor-Komplex (Frizzled/Low density lipoprotein receptor related protein) verhindert werden. Hierbei löst sich Axin aus dem Multiproteinkomplex, es kommt zur intrazellulären Akkumulation von β -Catenin, welches in den Zellkern wandert. Durch Assoziation mit Transkriptionsfaktoren der TCF/Lef-Familie (T Cell factor, Lymphoid enhancer factor) wird das Expressionsprofil in Richtung Proliferation beeinflussen (de Lau, et al., 2007: ; Muncan, et al., 2006: ; Reya and Clevers, 2005).

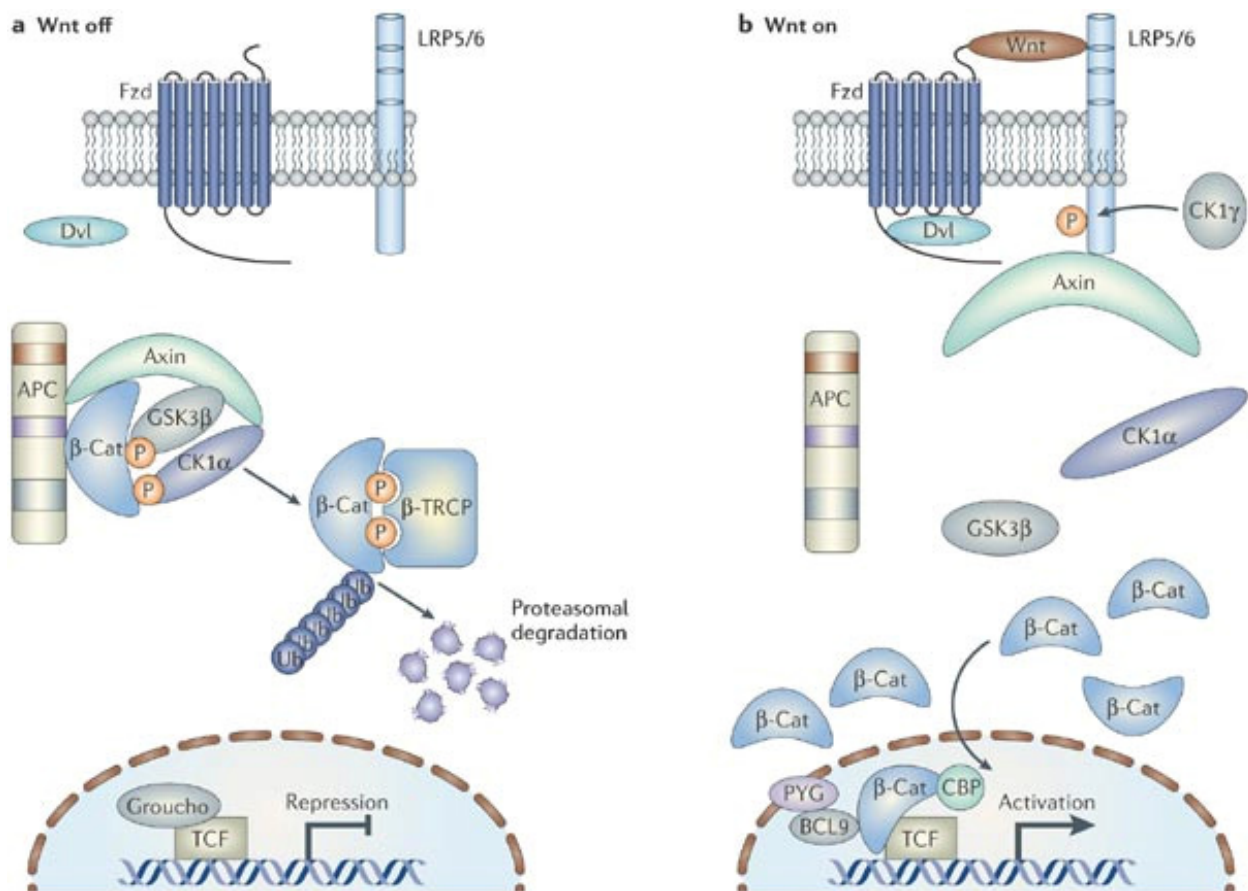


Abbildung 1.6: Wnt/β-Catenin-Signalweg: In Abwesenheit von Wnt (a) bindet β-Catenin an das Adenomatous polyposis coli-Protein (APC) und Axin, wobei es von Casein kinase Ia (CK1α) und Glycogen synthase kinase 3β (GSK3β) phosphoryliert wird. Eine anschließende Ubiquitinierung des β-Catenin durch β-Transducing repeat-containing protein (β-TRCP) bereitet den Abbau durch das Proteasom vor. Somit wird die Konzentration an β-Catenin im Zytosol aktiv auf niedrig Niveau gehalten. Innerhalb des Kerns sorgt eine Assoziation des Co-Repressors Groucho mit Transkriptionsfaktor-TCF für eine Inhibierung TCF-spezifischer Gene. Kommt es zur Ausschüttung von Wnt-Signal (b), kann dieses an den Rezeptor-Komplex Frizzled/Low density lipoprotein receptor related protein 5 bzw. 6 (Fzd/LRP5/6-Rezeptor) binden. Dies wiederum initiiert die Bindung vom Protein Dishevelled (Dvl) an den Fzd-Rezeptor, wobei es durch Casein kinase Iγ (CK1γ) vermittelt phosphoryliert des LRP5/6 zur Rekrutierung des Axins kommt. Eine Dissoziation des zuvor beschriebenen β-Catenin destruction complex ist die Folge und es kommt zur intrazelluläre Akkumulation von β-Catenin, welches in den Kern wandert und an Transkriptionsfaktoren der TCF/Lef-Familie (T Cell factor, Lymphoid enhancer factor) bindet. Durch Rekrutierung multipler Protein (CBP, BCL9, PYG) kommt es zur Transkription TCF/Lef-spezifischer Gene, welche die Zellproliferation steuern (Barker and Clevers, 2006).

Kommt es in der APC^{Min/+}-Maus zu einem Verlust des funktionalen APC-Allels, kann sich der β -Catenin destruction complex nicht mehr formieren, so dass anhaltend hohe Konzentrationen an β -Catenin im Zytosol und im Kern akkumulieren. Es kommt zur Wnt-unabhängigen konstitutiven Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs und zur anhaltenden Zellteilung. Der sich formierende Polyp (Adenom) reichert nach der Mehrstufen-Theorie von Kinzler und Vogelstein weitere Mutationen an (z.B. im Gen von Ras, Smad4, P53), was zum progressiv beschleunigten Wachstum des Tumors und schließlich zur Bildung eines Karzinoms führt (Kinzler and Vogelstein, 1998: ; Morin, et al., 1996: ; Rajagopalan, et al., 2003).

Das APC-Gen ist somit der „gatekeeper“ in der Tumorigenese im Darm bei Maus und Mensch (Levy, et al., 1994), (Fodde, et al., 1999: ; Johnson, et al., 2005: ; Nakayama, et al., 2002). Die APC^{min} Maus erlaubt daher über die Analyse der Quantität und Qualität der sich bildenden Tumore eine zuverlässige Identifizierung von weiteren Modulatoren der intestinalen APC-abhängigen Tumorigenese. Dieses biologische Testsystem ist aufgrund seiner hohen Reproduzierbarkeit und der bereits intensiv erfolgten Charakterisierung bestens geeignet, um sowohl diätetische, pharmakologische als auch genetische Interventionen und Prädispositionen herauszuarbeiten und zu analysieren.

2 Zielsetzung

In dieser Promotionsarbeit wurde die Bedeutung von Selen und SePP für die intestinale Tumorigenese untersucht. Aus Vorarbeiten war bekannt, dass in humanen Darmtumoren die SePP-Expression auf mRNA-Ebene reduziert ist. Inwieweit diese Reduktion kausal zur Tumorigenese beiträgt oder lediglich ein Epiphänomen darstellt, war nicht bekannt.

Aus diesem Grund sollte die in der Arbeitsgruppe etablierte SePP-defiziente Mauslinie mit einem intestinalen Tumormodell gekreuzt und analysiert werden. Hauptaugenmerk war hierbei neben der Etablierung dieses neuen doppelt-transgenen Tiermodells und dem direkten Studium der Bedeutung von SePP für den Darmkrebs auch die Entwicklung von molekularen und histochemischen Protokollen zur Charakterisierung der Tumorqualität in Selen- bzw. SePP-reichen und -armen Organismen. Die Ergebnisse sollten in erster Linie klären, inwieweit Selenoproteine kausal die Tumorigenese beeinflussen. Da SePP als Transportprotein den anderen Selenoproteinen übergeordnet ist, dürften die Ergebnisse geeignet sein, um zu entscheiden, ob eine diätetische oder pharmakologische Beeinflussung der Selenoprotein-Expression als chemopräventive Maßnahme aussichtsreich ist. Somit ergaben sich zu Beginn der Doktorarbeit die folgenden zentralen Fragestellungen:

- beeinflusst eine Beeinträchtigung des Selenmetabolismus, wie es im SePP-Tiermodell exemplarisch der Fall ist, die Tumorigenese im Intestinaltrakt?
- zeigt sich im Vergleich von heterozygoten und homozygoten SePP-Mäusen eine Gen-Dosis-Abhängigkeit des Effektes?
- welcher Aspekt der Tumorigenese, z.B. Initiation, Wachstum oder Differenzierungsgrad, verändert sich in Abhängigkeit von Selen und SePP?

Von den Ergebnissen wurde ein klarer Beitrag zum Verständnis der Bedeutung von Selen und SePP für das individuelle Krebsrisiko erwartet und Erkenntnisse zu den zugrunde liegenden molekularen Mechanismen erhofft.

3 Material

3.1 Geräte

Analysenwaage	CP 423S, Sartorius, Göttingen
Autoklav	Varioklav, H+P Labortechnik, Oberschleißheim
CO ₂ -Brutschrank	Heracell, Heraeus Sepatech, Osterode
Elektrophoresekammer	(vertikal), Bio-Rad Laboratories, München (horizontal), Roth, Karlsruhe
Fluorimeter	LS50B, PerkinElmer, Boston, USA
Heizblock	Digi-Block, Labortory Devices Inc, USA
Hybridisierungssofen	Hybridisierinkubator 7601, GLF, Burgwedel
Kühlzentrifugen	5417R, Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer	M 32, GLW, Würzburg
Microdismembrator	Modell U, B. Braun Biotech, Melsungen
Mikrowellenofen	Micro, Whirlpool, Schorndorf
Netzgeräte	EPS 601, Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA
pH-Meter	inoLab Benchtop, WTW, Weilheim
Phosphorimager	Cyclon, Perkin-Elmer, Boston, USA
Pipetten	Eppendorf Reference 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl Eppendorf, Hamburg
Präparierbesteck	Aesculap, AG&Co.KG, Tuttlingen FST Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
PCR-Cycler	Primus 25 und 96plus, MWG Biotech, Ebersberg
qPCR-Cycler	iCycler, Bio-Rad Laboratories, München
Röntgenfilmkassette	Kodak, Rochester, New York
Semidry-Elektroblotting	Trans-Blot SD, Biorad Laboratories, München
Stereomikroskop	SZ40, Olympus, Hamburg
Speedvac-Konzentrator	Savant Speedvac SC110
Spektrometer	Spectrophotometer U-2001, Hitachi, Deutschland
Sterilbank	HeraSafe, Heraeus Sepatech, Osterode
Tischphotometer	Biophotometer, Eppendorf, Hamburg

Transferblotapparatur	Transblot SD, Bio-Rad Laboratories, München
Tiefkühlschrank	HFU 486, Heraeus Sepatech, Osterode
UV-Crosslinker	UV Stratalinker 2400, Stratagene, La Jolla, CA, USA
UV-Flächenstrahler	Transilluminator N90, Th. Geyer, Renningen
UV-Transilluminator	V-90 M, Benda, Weisloch
Vakuumpzentrifuge	Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg
Vortex	Modell, Eppendorf, Hamburg
Waagen	CP 2201, Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Modell 1083, GFL, Burgwedel
Zellkulturmikroskop	Wilovert 30 Standard, Hund Wetzlar, Deutschland

3.2 Software und Datenbanken

Beacon Designer 3.0	Premier Biosoft, Palo Alto, CA, USA
Blat Search	UCSC Genome Browser Project (http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat)
Graphpad Prism 4.03	Graphpad Software, San Diego, CA, USA
MGI	Mouse Genome Informatics (http://www.informatics.jax.org/)
Microsoft Office 2002	Microsoft Deutschland, Unterschleißheim
NCBI	National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)
Optiquant Version 4.0	Packard Instruments Co, Meriden, USA
Reference Manager 11	Adept Scientific GmbH, Frankfurt
REST version 1.9.12	erstellt durch M. Herrmann, D. Chiew (Corbett Life Science Sydney, Australia) und Michael W. Pfaffl (Technische Universität München, http://rest.gene-quantification.info)

3.3 Chemikalien

3.3.1 Verbrauchsmaterialien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die verwendeten Verbrauchsmaterialien von den Firmen Merck Biosciences, Schwalbach; Carl Roth, Karlsruhe; Eppendorf, Hamburg; Peqlab Biotechnologie, Erlangen und Sigma-Aldrich, Taufkirchen bezogen. Die Chemikalien wiesen Analysenreinheit auf. Zuchtfutter für die Tiernahrung lieferte die Firma Altromin, Lage, Deutschland. Die Radiochemikalien ($\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP) wurden bei Hartmann Analytic, Braunschweig bestellt.

Kit- und System-Vertreiber:

RNA-Isolation	peqGOLD TriFast, pEQ-Lab, Erlangen
cDNA-Synthese	iScript, Bio-Rad Laboratories, München
qRT-PCR-Mix	ABolute QPCR SYBR Green, ABgene, Epsom, Großbritannien
Labeling Kit	NEB, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
RNA-Microarray	GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA, (Affymetrix)
Immunoassay	Lincoplex Cytokine Immunoassay Kit, Linco Research Inc., St. Charles, MO, USA

3.3.2 Oligonukleotide

In dieser Arbeit verwendete Primer wurden mit Hilfe der Software Beacon Designer 3.0 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, USA) erstellt und von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg) bzw. Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Die zugrunde liegenden cDNA-Sequenzen wurden anhand der Mouse Genome Informatics Datenbank (<http://www.informatics.jax.org/>) ermittelt. Mögliche Intron-Exon-Übergänge wurden mittels Blat Search (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) bestimmt.

4 Methoden

4.1 Zellkultur

Im Rahmen dieser Arbeit wurden humane Kolonkarzinoma-Zelllinien aus hausinternen Beständen eingesetzt. Neben HT29 (ATCC Nummer: HTB-38) wurden auch HCT116 (ATCC Nummer: CCL-247)-Zellen verwendet. Bei beiden Zelllinien handelt es sich um gut charakterisierte *in vitro*-Modelle für humane Darmkrebszellen. Zusätzlich wurden auch LIM1215-Zellen (Whitehead, et al., 1985) eingesetzt. Alle drei Zelllinien wuchsen als polarisierte Monolayer.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in unbeschichteten T150-Flaschen (Sarstedt, Nümbrecht) in DMEM-Medium (F12 (Invitrogen / Gibco) + 1 % Penicillin/Streptomycin (v/v) bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchte im Inkubator. Ein Mediumwechsel wurde alle drei Tage durchgeführt. Bei Konfluenz wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% Trypsin; 0,02% EDTA) für 3 bis 5 min inkubiert und mit 5 ml Medium vom Flaschenboden gespült. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (Raumtemperatur (RT), 5 min, 1000 g) aufkonzentriert. Das Zellpellet wurde im entsprechenden Volumen des Kulturmediums resuspendiert und auf die Kulturflaschen verteilt.

4.2 Mausezucht und Genotypisierung

4.2.1 Zucht und Haltung

Die Züchtung der Mäuse wurde im Tierstall des Instituts für Experimentelle Endokrinologie unter Mitwirkung des fachlich ausgebildeten Personals durchgeführt. Die Mäuse wurden in vollklimatisierten Räumen im zwölfstündigen Hell-Dunkel-Zyklus auf Standard-Nager-Diät (Haltungsfutter 1326, Zuchtfutter 1314, Altromin, Lage) gehalten.

Zur Untersuchung des Einflusses von SePP auf die intestinale Tumorentstehung wurde das Min-Allel mittels APC^{Min/+}-Mäusen (bezogen von The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) in die SePP-Zucht eingekreuzt (Genehmigungsnummer: LaGetSi Berlin, G0025/03). Da SePP- wie auch die APC^{Min/+}-Mäuse einen C57Bl/6-Hintergrund aufwiesen, war eine Auskreuzung des aus der Verpaarung resultierenden doppelt-transgenen APC-min/SePP-Stammes nicht notwendig.

Die Zucht des APC/SePP-Stammes erfolgte durch jeweils zwei heterozygote SePP-Tiere, wobei das Min-Allel zumeist durch den Vater übertragen wurde (APC^{Min/+}/SePP^{+/-} x SePP^{+/-}).

4.2.2 Isolierung genomischer DNA

Für die Genotypisierung wurden Hautproben aus Ohrstanzen verwendet, die beim Nummerieren der einzelnen Tiere anfielen. Nach einem Proteinase K-Verdau wurde die DNA an Glasmilch gebunden und gereinigt. Der so isolierten genomischen DNA konnte dann mit Hilfe der PCR ein Genotyp eindeutig zugeordnet werden.

Dazu wurde eine Ohrstanze (Durchmesser 2 mm) über Nacht bei 37 °C in 100 µl Proteinase K (1x DNA-Isolationspuffer, 10 µg Proteinase K) verdaut. Die Lyse wurde durch Zentrifugieren (20.000 g, 1 min) von unverdauten Resten befreit und im Anschluss wurde die Proteinase K hitzeinaktiviert (96 °C, 5 min).

Zusatz von 1 ml NaI-Bindelösung verringerte die Konzentration an freiem Wasser in dem Maße, dass die DNA an die als 3 µl Glasmilch (50 %, v/v) zugefügte Silicatmatrix binden konnte.

Die Suspension wurde durch Zentrifugieren (4.000 g, 5 min) pipettiert, erneut in 250 µl NaI-Bindelösung resuspendiert und konzentriert (4.000 g, 5 min). Reste an NaI wurden durch zweimaliges Waschen mit ethanolischer NEET-Lösung (je 1 ml) entfernt. Ethanolreste wurden in der Vakuumzentrifuge abgezogen.

Die an der Silicamatrix haftende DNA wurde durch Zugabe von 30 µl ddH₂O und Erhitzen auf 50 °C für 10 min eluiert. Nach Sedimentieren (20.000 g, 5 min) der Glasmilch konnte die im Wasser gelöste DNA als Template für die Genotypisierungs-PCR abgenommen und eingesetzt werden.

2x DNA-Isolationspuffer:

Tris, pH 7,4	20 mM
NaCl	10 mM
SDS	2 % (w/v)
EDTA, pH 8,0	50 mM

Glasmilch –Aufschlammung in ddH₂O:

SiO ₂ -Pulver (15 µm)	50 % (v/v)
----------------------------------	------------

NaI-Bindelösung:

NaI	6,06 M
NaSO ₃	0,12 M

NEET-Lösung:

Ethanol	50 %
NaCl	10 mM
EDTA, pH 8,0	1 mM
Tris, pH 7,5	10 mM

4.2.3 Genotypisierung des APC/SePP Stammes

Die Genotypen der einzelnen Tiere wurden mittels PCR bestimmt. Die im Falle des SePP-Allels verwendeten Primer entstammen dem im Labor etablierten Protokoll (Primersequenzen. siehe 3.3.2) (Schomburg, et al., 2003). Im Falle des Min-Allels wurden die Empfehlungen von Jackson Laboratory befolgt. Die jeweiligen Ansätze wurden wie nachfolgend pipettiert und die DNA im Thermocycler mit dem entsprechenden Programm amplifiziert.

PCR-Mix für APC-Allel:

Template-DNA (ca. 5 ng/μl)	3 μl
10x PCR-Puffer (Qiagen)	2,3 μl
MgCl ₂ (25 mM)	1 μl
dNTP-Mix (je 10 mM)	0,5 μl
FmAPCjax (25 μM)	1 μl
FmAPC2jax (25 μM)	1 μl
RmAPCjax (25 μM)	1 μl
Taq-Pol. (5 U/μl, Qiagen)	0,1 μl
mit ddH ₂ O auffüllen auf	23 μl

Programmierung des Thermocyclers:

Denaturieren	95 °C, 3 min	
Denaturieren	95 °C, 20 sec	
Annealing	52 °C, 15 sec	45x
Elongation	72 °C, 45 sec	
Elongation	72 °C, 5 min	
Abkühlen	auf 8 °C	

PCR-Mix für SePP-Allel:

Template-DNA	3 µl
10x PCR-Puffer (Qiagen)	2,3 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	0,5 µl
FKOLZ2 (25 µM)	1 µl
RKOLZ2 (25 µM)	1 µl
Rev-mSEPPPro2 (25 µM)	1 µl
Taq-Pol. (5 U/µl, Qiagen)	0,1 µl
mit ddH ₂ O auffüllen auf	23 µl

Programmierung des Thermocyclers:

Denaturieren	95 °C, 3 min	
Denaturieren	95 °C, 20 sec	
Annealing	52 °C, 15 sec	45x
Elongation	72 °C, 45 sec	
Elongation	72 °C, 5 min	
Abkühlen	auf 8 °C	

Die PCR-Produkte wurden im 1,5 % SB-Agarosegel (10 V/cm) aufgetrennt. Zur Minimierung des Hintergrunds wurde das Ethidiumbromid (EtBr) dem Probenpuffer zugesetzt. Die aufgetrennten PCR-Produkte wurden unter dem UV-Licht visualisiert.

SB-Agarosegel:

Agarose	1,5 % (w/v)
---------	-------------

In 1x SB-Laufpuffer

DNA-Probenpuffer (5x):

Glycerol	50 % (v/v)
----------	------------

SB-Puffer	5x
-----------	----

EDTA	0,0125 M
------	----------

1 %ig EtBr-Lsg. (w/v)	1 % (v/v)
-----------------------	-----------

Bromphenolblau	0,01 % (w/v)
----------------	--------------

SB-Laufpuffer (1x):

NaOH	0,01 M
------	--------

Borsäure	0,0365 M
----------	----------

pH 8,5	mit Borsäure
--------	--------------

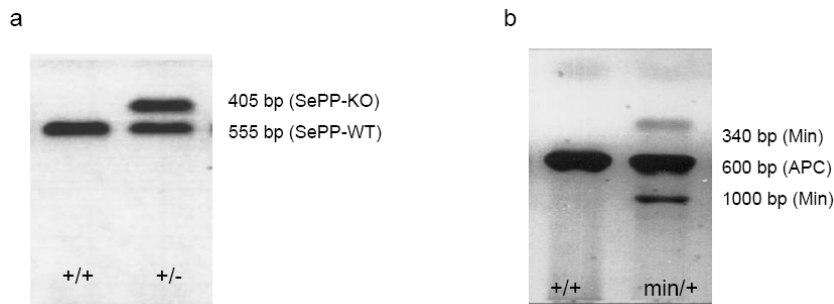


Abbildung 4.1: Genotypisierung von SePP- bzw. APCmin-Mäusen: Beispiel einer Genotypisierungs-PCR für SePP (Primertriplet: FKOLZ2 / RKOLZ2 / Rev-mSEPP02) bzw. APCmin (Primertriplet: Fm-APCjax / Fm-APC2jax / Rm-APCjax). Die jeweiligen PCR-Produkte wurden im 1,5 % SB-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. In der Genotypisierung auf SePP (a) ist exemplarisch ein Wildtyp (+/+) und ein SePP heterozygoter (+/-) Ansatz zu sehen. Die APCmin-PCR (b) zeigte eine Wildtyp (+/+) und eine APCmin (min/+) Maus.

4.3 Darm- und Tumorpräparation

4.3.1 Darmpräparation für histologische Analysen

Die Tiere wurden in einem Alter von 120 Tagen durch Begasung mit CO₂ getötet. Der Gastrointestinaltrakt wurde entnommen, von Fett und pankreatischem Gewebe befreit. Dünn- und Dickdarm wurden auf Whatman-Papier (getränkt in 1x PBS) gebettet, wobei der Dünndarm in drei gleiche Abschnitte (hier als DüDa I, DüDa II, DüDa III, stehend für die proximale, mediale und distale Sektion des Dünndarms) geteilt wurde (siehe Abbildung 4.2). Die Darmabschnitte wurden longitudinal geöffnet, vom Inhalt befreit und in Fixierlösung denaturiert (4 °C, 1-2 d). Zur Vereinfachung der Auswertung wurden die einzelnen Darmabschnitte mit Färbelösung getränkt (1-2 min), um im Anschluss mit 1x PBS bis zu einem guten Kontrast entfärbt zu werden.

Fixierlösung:

Formaldehyd, 37%, Roth	4 % (v/v)
PBS	1x

Färbelösung:

Methylenblau	0,01 % (w/v)
Formaldehyd, 37%	4 % (v/v)
PBS	1x

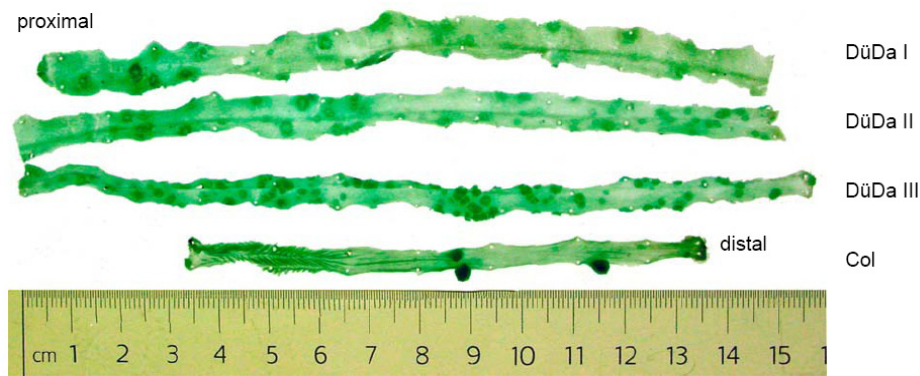


Abbildung 4.2: Darmabschnitte einer APC^{min}-Maus: Der longitudinal geöffnete Verdauungs-tract einer 120 Tage alten APC^{Min/+}-Maus wurde unterteilt. Wobei (DüDa I) für den proximale, (DüDa II) für die mediale und (DüDa III) für die distale Teil des Dünndarms stehen. Der Dickdarm (Col) wurde nicht portioniert. Zur Verbesserung des Kontrastes wurde der fixierte (4% Formaldehyd) Darm mit Methylenblau gefärbt. Als dunklere Punkte, treten die einzelnen Tumore deutlich hervor.

Die Auswertung der einzelnen Darmabschnitte erfolgte durch zwei unabhängige Wissenschaftler (Binokular, 10x Vergrößerung). Hierbei wurden mittels einer Schablone die Durchmesser der Tumore in Größen unterteilt ($S < 0,25$ mm; $1 < 0,5$ mm; $2 < 1$ mm; $3 < 1,5$ mm; $4 < 2$ mm; $5 < 2,5$ mm; $6 < 3$ mm; $L > 3$ mm) und die jeweilige Anzahl und Lage bestimmt.

4.3.2 Tumorpräparation für Transkriptomanalyse

Für die Präparation von RNA bzw. Proteinen waren Formaldehyd-fixierte Darmabschnitte ungeeignet. Für diesen Fall bewährte sich die nachstehende Präparationsmethode.

Der Darm wurde wie oben beschrieben entnommen und von Fett und Pankreas befreit. Zur weiteren Präparation und Entleerung wurden die Eingeweide auf Eis gekühlt, bevor sie auf Whatman-Papier gebettet und in RNase-hemmenden Puffer über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt wurden. Die hohe Konzentration an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in diesem Puffersystem band das freie Wasser und sorgte so für eine effektive Hemmung RNA-abbauender Enzyme.

RNase-hemmender Puffer:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6,1 M
EDTA	10 mM
$\text{Na}_3\text{-Citrat}$ (1 M)	25 mM
pH 5,2 mit	H_2SO_4

4.4 Histologische Methoden

Einzelne Darmabschnitte wurden histomorphologisch untersucht. Hierzu wurde der Formaldehyd-fixierte Darmabschnitt einer „Swissroll“ (oder Rollmops) ähnlich aufgerollt. Die Einbettung in Paraffin, das Schneiden (2 µm) wie auch das Färben (Hämatoxylin-Eosin) wurden vom Institut für Pathologie der Charité durchgeführt.

Ausgewertet wurden die einzelnen Schnitte von zwei geschulten Pathologen (PD Dr. Carsten Denkert, Dr. Wilko Weichert, Institut für Pathologie der Charité). Zum einen wurde die Tumoranzahl bestimmt, zum anderen wurden die Tumore, abhängig vom Entartungszustand, unterteilt (hoch- und geringgradig differenzierte Tumore). Eine statistische Aussage wurde anhand des Student's t-Test getroffen.

4.5 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders beschrieben kamen etablierte Protokolle zur Anwendung, welche im Handbook Molecular Cloning (Molecular Cloning, Joseph Sambrook, David W. Russell, ISBN 0-87969-577-3) beschrieben sind, oder es wurde den Anweisungen der Hersteller Folge geleistet.

4.5.1 Probenaufarbeitung und -aufbewahrung

Gewebeproben wurden, wenn nicht anders erwähnt, nach Entnahme auf Trockeneis eingefroren und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert. Größere Gewebe wurden unter Kühlung durch flüssigen Stickstoff im Microdismembrator zu Gewebepulver verarbeitet. Diese Behandlung erlaubte ein besseres Aliquotieren der Probe und sorgte zugleich für homogenes Probenmaterial.

4.5.2 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA erfolgte mit der Methode der Guanidinisothiocyanat- (GTC) Extraktion nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987). Von Peqlab Biotechnologie (Erlangen) wurde die phenolische GTC-Lösung (peqGold RNA-Pure) bezogen, wobei nach den Empfehlungen des Herstellers gearbeitet wurde.

Kurz zusammengefasst wurden ca. 200 mg Gewebepulver mit 1 ml GTC-Lösung versetzt, wobei das zähe Gemisch mehrmals durch eine Spritze mit 24G-Kanüle (Microlance 24G, BD, Drogheda, Irland) gezogen wurde. Die in der Kanüle auftretenden Scherkräfte bewirkten die Entstehung einer leicht viskosen Lösung, in der die Gewebezellen komplett aufgeschlossen waren. Der Ansatz wurde mit 200 µl Chloroform ausgeschüttelt (vortexen) und durch Zentrifugieren (14.000 g, 4 °C, 5 min) die Phasentrennung forciert. Die obere wässrige Phase wurde entnommen und mit 500 µl 2-Propanol versetzt, wobei die ausgefallene RNA nach 5-10 min sedimentiert (14.000 g, 4 °C, 5 min) wurde. Das RNA-Pellet wurde zweimal mit 1 ml 75 % Ethanol (v/v) gewaschen. Überschüssiges Ethanol wurde in der Vakuumzentrifuge entfernt, bevor die isolierte RNA in ddH₂O (DEPC-behandelt) gelöst wurde.

Die Nukleinsäurelösung wurde im UV/VIS-Spektrophotometer bei 260 nm vermessen. Anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes konnte die Konzentration, die direkt proportional zur Absorption ist, bestimmt werden (mittlerer Extinktionskoeffizient für RNA: $\epsilon_{260\text{ nm}} = 25 \text{ l} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Um eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäuren zu treffen, wurde das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Dieses sollte im Falle von RNA zwischen 1,6 und 2,0 liegen.

4.5.3 Northern Blot

Zur Quantifizierung von Transkripten stellt der Northern Blot ein robustes Standardverfahren dar. Hierzu wurde RNA-Lösung in denaturierendem Probenpuffer suspendiert. Die RNA wurde durch Erwärmen (55 °C, 5 min) denaturiert und im Anschluss in Eiswasser abgeschreckt. Die Auftrennung der RNA erfolgte im horizontalen denaturierenden Agarosegel (90 V, 2-3 h, Laufpuffer 1x MOPS). Im Anschluss wurde das Gel fotografiert. Hierbei sollte die Bande der 28S rRNA mindestens doppelt so hell fluoreszieren wie die der 18S rRNA, da sie mehr als doppelt so lang ist (5000 nt versus 2000 nt).

Die RNA wurde mittels Kapillarblot (10x SSC, 2-3 Tage) vom Gel auf eine Nylonmembran (Nytran 1.2N, Schleicher & Schuell, Dassel) transferiert und im Anschluss mittels UV-Licht (254 nm, 120 mJ/cm²) kovalent auf die Membran gebunden. Dies erlaubte es, die Membran nach erfolgter Hybridisierung zu waschen und weitere Male zu hybridisieren.

Die Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten erfolgte im Hybridisierungssofen in rotierenden Glasflaschen. Hierzu wurde die Membran zuerst vorhybridisiert (Prähybridisierungslösung, 40 °C, 2-3 h) und im Anschluss hybridisiert (Hybridisierungslösung, 40 °C, über Nacht). Bevor die Hybridisierungslösung auf den Blot gelangte, wurde sie denaturiert (96 °C, 10 min; Abschrecken auf Eiswasser, 5 min). Ein sukzessives Waschen mit sinkender Salzkonzentration und Erhöhung der Temperatur (2x SSPE / 0,5 % SDS, 50 °C, 15 min; 1x SSPE / 0,5 % SDS, 55 °C, 15 min; 0,5x SSPE / 0,5 % SDS, 60 °C, 30 min) erlaubte ein Entfernen nicht spezifisch gebundener ³²P-DNA-Fragmente.

Die Visualisierung des Hybridisierungsergebnisses erfolgte mittels Phosphorimager (Cyclon, Perkin-Elmer, Boston, USA). Falls hierbei das Hintergrundsignal zu stark war, wurde erneut mit 0,2x SSEP / 0,5 % SDS, 60 °C, 15 – 60 min gewaschen.

Zur Auswertung der Signale wurde das Programm OptiQuant v3.0 (Packard Instruments, Meriden, CT, USA) verwendet.

10x MOPS:

MOPS	0,2 M
NaOAc	0,05 M
EDTA (0,5 M)	0,01 M
pH 7,0	

20x SSC:

NaCl	3,0 M
Na-Citrat	0,3 M
pH 7,0 mit	HCl

Formaldehyd-Agarosegel:

Agarose	1,5 % (w/v)
MOPS	1x
Formaldehyd	5 % (w/v)

20x SSPE, pH 7,4:

NaCl	3,0 M
NaH ₂ PO ₄	0,2 M
EDTA	0,025 M

RNA-Probenpuffer (2x):

Formamid	50 % (v/v)
Formaldehyd	30 % (v/v)
Glycerol	10 % (v/v)
MOPS	2x
1 %ig EtBr	1 % (v/v)

Prähybridisierungslösung:

Formamid	50 % (v/v)
SSPE	6x SSPE
SDS	0,5 % (w/v)
ssDNA	100 µg/ml

(denaturierte Heringssperma DNA)

Hybridisierungslösung:

1x Prähybridisierungslösung

+ ³²P-makierte DNA Sonde

Waschpuffer:

SSPE	2x, 1x, 0,5x
SDS	0,5 % (w/v)

4.5.4 cDNA-Synthese

Die Reverse-Transkription der RNA in cDNA erfolgte mit einem Mix aus Random-Hexamer- und Oligo-dT-Primern. Zum Einsatz kam das iScript-System (Bio-Rad Laboratories, München), wobei dem mitgelieferten Protokoll folgend 1 µg Gesamt-RNA mit 2 µl 5x Reaktionspuffer, ddH₂O (auffüllen auf 19 µl) sowie Reverser-Transkriptase (1 µl) gemischt, bei 42 °C für 30 min inkubiert und anschließend noch auf 85 °C erhitzt (5 min) wurde.

4.5.5 ³²P-Sondenmarkierung

Die für die Northern Blot-Hybridisierung eingesetzten Sonden wurden entweder aus hausinternen Plasmiden oder mit spezifischen Primern aus cDNA amplifiziert. Die PCR-Produkte (ca. 300-500 bp) wurden über 1 % Agarosegele von nicht eingebauten Nukleotiden gereinigt. Die jeweiligen DNA-Fragmente wurden aus der Agarose analog der Methode der DNA-Isolierung mittels Glasmilch (siehe 4.2.2) separiert. In Abwandlung wurde das Agarosegel nach Zugabe von NaI-Bindelösung (2-3 ml NaI-Lösung pro Gramm Agarosegel) bei 50 °C geschmolzen, um entsprechend weiter prozessiert zu werden.

Das isolierte DNA-Fragment wurde mittels Labeling Kit von NEB (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) ^{32}P -markiert. Hierbei wurden den Herstellerangaben folgend 25 ng DNA mit 32 μl ddH₂O versetzt. Der Mix wurde auf 96 °C (5 min) erhitzt und im Anschluss in Eiswasser abgeschreckt (5 min). Nachfolgend wurden auf Eis 5 μl Labeling Puffer (10x), 2 μl dATP, 2 μl dTTP, 2 μl dGTP, 1 μl Klenow-Fragment (5 U) und 5 μl ^{32}P -dCTP (3000 Ci/mmol) gemischt, bei 37 °C (1 h) inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 5 μl EDTA (0,2 M) gestoppt.

Die überschüssigen Nukleotide wurden über eine Sephadex G-50-Säule (Microspin G-50 Columns, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) abgetrennt. Die ^{32}P -markierte Sonde wurde zur Denaturierung in 100 μl Prähybridisierungslösung aufgenommen, auf 95 °C (5 min) erhitzt, um im Anschluss in Eiswasser abgeschreckt zu werden. Zum Einsatz für die Northern Blot-Hybridisierung wurde die Hybridisierungslösung mit weiteren 10 ml Prähybridisierungslösung versetzt.

4.5.6 Amplifikation durch PCR

Durch die „polymerase chain reaction“ (PCR) lassen sich *in vitro* gezielt DNA-Fragmente exponentiell synthetisieren. In Analogie zu den Empfehlungen des Herstellers wurde folgender PCR-Mix auf Eis pipettiert:

PCR-Mix:

Template-DNA	ca. 50 ng
10x PCR-Puffer (Qiagen)	2,3 μl
MgCl ₂ (25 mM)	1 μl
dNTP-Mix (je 10 mM)	0,5 μl
„forward“ Primer (25 μM)	1 μl
„reverse“ Primer (25 μM)	1 μl
Taq-Polymerase (Qiagen)	0,1 μl
mit ddH ₂ O auffüllen auf	23 μl

Programmierung des Thermocyclers:

Denaturieren	95 °C, 3 min	
Denaturieren	95 °C, 15 sec	
Annealing	52 °C, 30 sec	45x
Elongation	72 °C, 30 sec	
Elongation	72 °C, 2 min	
Abkühlen	auf 8 °C	

Die Annealing-Temperatur war maßgeblich von der Sequenz und der Länge der Oligonukleotide abhängig. Die hier erwähnte Annealing-Temperatur war nur ein Richtwert, welcher für das jeweilige Experiment variiert wurde. Ähnliches galt für die Zeit der Elongation. Die DNA-Polymerase verlängert die Primer um ca. 900 bp pro Minute. Somit richtet sich die Dauer der Elongation nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes.

4.5.7 Real time-PCR

Zur vergleichenden Analyse der Transkriptkonzentrationen wurde auf die Methode der Real time-PCR zurückgegriffen. Hierbei war eine vergleichende Analyse auch gering exprimierter mRNA-Mengen in kleinen Probevolumina möglich. Die dabei verwendete Methode der Detektion basierte auf den DNA-interkalierenden Eigenschaften von SYBR Green.

Die Primer wurden unter Zuhilfenahme der Software Beacon Designer (Premier Biosoft, Palo Alto, CA, USA) ausgewählt. Wenn möglich, sollten die Primer eine Länge von 18-22 bp haben und am 3'-Ende möglichst eine oder zwei Purinbasen enthalten. Um eine Amplifikation von genomischer DNA auszuschließen, wurde versucht, die Primer Intron-überspannend auszuwählen.

Vor dem Einsatz der jeweiligen Primerpaare wurden die Amplifikationseigenschaften anhand einer Positivkontrolle (Mix aller zu messenden cDNAs eines Probensets) und einer Negativkontrolle (ddH₂O) getestet. Bei unspezifischer Amplifikation wurden im gegebenen Fall neue Primerpaare ausgewählt.

Ebenso wurde auch für jeden Syntheseansatz die Effizienz der Amplifikation mittels einer Verdünnungsreihe analysiert. Die Analyse der einzelnen Proben erfolgte in Triplikaten. Die Reagenzien wurden auf Eis zusammen pipettiert. Nachstehend ein Beispielansatz:

Real time-PCR-Mix:

cDNA Template (1/10 verd.)	5 µl
2x SYBR Green Master Mix	12,5 µl
„forward“ Primer (25 nM)	1 µl
„reverse“ Primer (25 nM)	1 µl
mit ddH ₂ O auffüllen	25 µl

Programmierung des Thermocyclers:

Hotstart-Taq Aktivierung	95 °C, 15 min	
Denaturieren	95 °C, 10 sec	
Annealing	58 °C, 15 sec	50x
Elongation	72 °C, 15 sec	
Elongation	72 °C, 3 min	

Da die Fluoreszenz des SYBR Green nicht zwischen spezifischer und unspezifischer Amplifikation diskriminiert, wurde im Anschluss an jede Real time-PCR eine Schmelzkurvenanalyse des Produktes durchgeführt. Des Weiteren wurden die jeweiligen Reaktionsansätze auf einem 1%igen (w/v) Agarosegel (1x SB) analysiert.

Die relative Quantifizierung erfolgte mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Hierbei wurde der durch die Software (Bio-Rad Laboratories, München) ermittelte C_t -Wert jeder cDNA Probe auf ein ebenfalls gemitteltetes Referenzgen (18S rRNA) bezogen. Die sich hieraus ergebenden normalisierten Werte (ΔC_t) wurden mit der Software REST (Version 1.9.12, <http://rest.gene-quantification.info/>) statistisch ausgewertet (relative Expression bezogen auf die Vergleichsgruppe und statistische Signifikanz) (Pfaffl, et al., 2002).

4.5.8 Transkriptionsanalyse mittels Microarray

Für die vergleichende Transkriptomanalyse bot sich die Methode der Microarrays an. Hierbei kann nahezu das gesamte mRNA-Profil aus einer einzigen Präparation bestimmt werden. Die hier verwendeten Genchips (Gene-Chip Mouse Genome 430 2.0 Array, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) repräsentierten ca. 39.000 Gene/EST-Einträge (Affymetrix). Es wurden jeweils Gensequenzen der Datenbanken dbEST (NCBI, Juni 2002), GenBank (NCBI, Release 129, April 2002), und RefSeq (NCBI, Juni 2002) berücksichtigt (Affymetrix). Jedes einzelne Gen war auf dem Chip in 11-facher Ausführung als ca. 25 bp langes Oligomer vertreten (Alberts, et al., 2007). Die Sequenz der mittels Fotolithographie synthetisierten Oligonukleotide entsprach der cDNA, war also dem Transkript komplementär und wurde als PM (Perfect Match) bezeichnet. Direkt neben einer PM-Zelle wurde ein

Oligonukleotid mit einem homomeren Basenaustausch in der Mitte des Oligonukleotids synthetisiert und als MM (MisMatch) bezeichnet. Somit bestand ein Probenpaar (PP) aus einer PM- und einer MM-Zelle. 11 Probenpaare mit 11 verschiedenen Sequenzen wurden als Probenstet (PS) zusammengefasst und entsprachen einem Gene/EST. Um Fehler durch lokale Hybridisierungsartefakte zu minimieren, wurden die PP eines PS nicht direkt nebeneinander positioniert, sondern über den gesamten Chip verteilt. Dieser Aufbau der Genchips erlaubte es, Hybridisierungsexperimente unterschiedlicher cDNA-Proben quantitativ zu vergleichen.

Zur Beurteilung, ob ein Gen exprimiert ist, hat sich die Bezeichnung „Present/Absent call“ durchgesetzt. Der hierbei ermittelte Detektionsvertrauenswert „Detection p-Value“ gibt Antwort über die Güte der Hybridisierungen in den einzelnen PP. Eine PS gilt als anwesend bzw. exprimiert, wenn der p-Value < 0,05 ist (Affymetrix, ; McClintick and Edenberg, 2006; ; Shedden, et al., 2005).

Verglichen wurden APC^{Min/+}/SePP^{+/-}-Tumore und Tumore aus APC^{Min/+}-Tieren. Da jeder Tumor auf ein singuläres Ereignis zurückgeht, wurde zur Minimierung individueller Eigenheiten nicht mit einzelnen Tumoren gearbeitet, sondern mit jeweils einem Pool aus mehreren Tumoren (ca. 8 bis 10 Tumore ähnlicher Größe). Die Tumore stammten aus Tieren gleichen Wurfs und Geschlechts und wurden aus in RNase-hemmenden Puffer konservierten Dö-Da III-Gewebeproben präpariert. Die Extraktion der RNA erfolgte mit der GTC-Methode (siehe 4.6.2). Zusätzlich wurde die RNA mittels RNeasy-Säulen (RNeasy-Kit, Qiagen, Hilden) den Herstellerangaben folgend gereinigt.

Die reverse Transkription und Biotin-Markierung der RNA und die Hybridisierung wurde vom Servicezentrum der Charité (Dr. U. Ungethüm, Labor für Funktionelle Genomforschung LFGE, Charité, Berlin) vorgenommen. Zur Normalisierung der Ergebnisse und Ermittlung der p-Values konnte auf die Expertise von Dr. R.J. Kuban (Labor für Funktionelle Genomforschung LFGE, Charité, Berlin) zurückgegriffen werden. Hierbei kam das Programm GCOS 1.4 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) zur Anwendung. Eine weitere Prozessierung der normalisierten Daten wurde in GeneSpring 4.2 (Silicon Genetics, Redwood City, CA, USA) bzw. in MS-Excel (Microsoft Office 2002 Microsoft Deutschland, Unterschleißheim) vorgenommen. Berücksichtigt wurden nur Transkripte, die in mindestens einem der Genchips „Present“ (p-Value < 0,05) waren. Eine Validierung einzelner Gene wurde nachfolgend mittels Real time-PCR vorgenommen.

4.5.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970) erlaubt es, Proteine der Größe und Ladung nach aufzutrennen.

Die hier verwendeten 10%igen Polyacrylamidgele wurden zwischen zwei vertikalen Glasplatten gegossen und mit 1-Butanol überschichtet. Nach dem Polymerisieren wurde das Butanol entfernt und das Trenngel gegossen.

Das Gel wurde mit ca. 20-30 µg Protein beladen, welches zuvor in Probenpuffer aufgenommen, bei 55 °C denaturiert und in Eiswasser abgeschreckt wurde. Als Größenvergleich wurde zusätzlich zu den Proteinen ein Marker (Prestained Marker, New England BioLabs, Ipswich, USA) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x Elektrophoresepuffer bei 80-100 V.

Trenngelpuffer, pH 8,8:

Tris	1,5 M
SDS	0,4% (w/v)

Sammelgelpuffer, pH 6,8:

Tris	0,5 M
SDS	0,4% (w/v)

Trenngel (10% AA):

40% Acrylamid/ Bisacrylamid (29:1)	2 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml
ddH ₂ O	5,4 ml
10% SDS	80 µl
TEMED	4 µl
10% (w/v) APS	40 µl

Probenpuffer (4x):

Tris (pH 7,5)	0,2 M
Glycerol	50% (v/v)
SDS	4% (w/v)
DTT	125 mM
Bromphenolblau	0,04 %

Sammelgel (4,5% AA):

40% Acrylamid/ Bisacrylamid (29:1)	560 µl
Sammelgelpuffer	1,25 ml
ddH ₂ O	3,1 ml
10% SDS	50 µl
TEMED	2,5 µl
10% (w/v) APS	25 µl

Elektrophoresepuffer (1x), pH 8,3:

Glycin	192 mM
Tris	25 mM
SDS	0,1% (w/v)

4.5.10 Western Blot

Die durch SDS-PAGE nach Größe aufgetrennten Proteine wurden mittels Semidry-Elektroblotting (1 mA/cm², ca. 3-4 h) vom Gel auf eine Membran (Optitran BA-S85, Schleicher & Schuell, Dassel) transferiert.

Zur Kontrolle des Protein-Transfers wurde die Membran mittels Ponceau-Färbung angefärbt. Im Anschluss wurde die Membran in Trockenmilchlösung blockiert (1x Block-Lösung, RT, 1 h), bevor der Primär-Antikörper (hSePP-5c, 1,8 µg/ml; BRAHMS AG, Hennigsdorf; 1:2000 verdünnt in 1x Block-Lösung) über Nacht (4 °C) binden konnte. Nicht-spezifisch gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen (1x TBST, je 10 min, Schüttelinkubator) heruntergelöst, so dass der in Block-Lösung gelöste Sekundär-Antikörper (donkey-anti-sheep IgG, DAKO, Dänemark; 1:10.000 verdünnt in 1x Block-Lösung) auf die Membran gegeben werden konnte (2 h, RT). Die Membran wurde erneut dreimal gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran in ECL-Lösung (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) inkubiert, so dass das darin enthaltene Luminol durch enzymatische Katalyse der am Sekundär-Antikörper gebundenen Peroxidase (HRP) abgebaut werden konnte. Mit der hierbei frei werdenden Chemilumineszenz wurden Röntgenfilme (X-Omat 100, Eastman Kodak Company, New York, USA) belichtet.

Transfer-Puffer (1x), pH 8,3:

Glycin	190 mM
Tris	25 mM
Methanol	10% (v/v)

TBST-Lösung (1x), pH 8:

Tris	25 mM
NaCl	125 mM
Tween 20	0,3 % (v/v)

Ponceau-Färbung:

Ponceau S	0,1% (w/v)
Trichloressigsäure	3% (w/v)
Sulfosalicylsäure	3% (w/v)

Block-Lösung:

Trockenmilch (Fluka, Seelze)	5 % (w/v)
TBST	1x

4.5.11 Proteinhomogenat

Die Bestimmung selenabhängiger Enzyme erforderte es, native Proteinhomogenate zu erstellen, welche auch für die Messung des Selengehalts eingesetzt werden konnten.

Es wurde jeweils eine Spatelspitze (ca. 200 µg) Gewebepulver mit 1 ml kaltem Homogenisationspuffer (1x) aufgenommen. Die Mischung wurde zehnmal durch eine Kanüle (Microlance 24G, 0,55 mm x 25 mm, BD, Droghe-da, Irland) gezogen, um durch Scherkrafteinwirkung ein Aufbrechen von Zellverbänden und einzelnen Zellen und eine Fragmentierung der hochmolekularen genomischen DNA zu einer gering viskosen annähernd transparenten Lösung zu erreichen. Durch Zentrifugation (20.000 g, 4°C, 10 min) wurde in eine Zytosol-Fraktion (Überstand) und eine Membran-Fraktion (Pellet) grob aufgeteilt.

Enzyme wie TxnRd und GPx wurden aus der Zytosol-Fraktion gemessen.

Zur Normalisierung wurde die Proteinkonzentration der einzelnen Proben mit der colorimetrischen Methode nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976). Dem lag eine Absorptionsverschiebung (465 nm zu 595 nm) im sauren Milieu von Coomassie Brilliant Blue G-250 bei Bindung von Protein an den Farbstoff zugrunde.

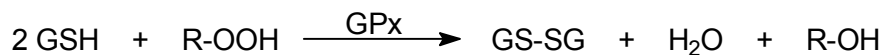
Die Färbelösung Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad Laboratories, München) wurde mit Wasser (1:5) verdünnt. Jeweils 200 µl der Lösung wurden mit 5 µl vorgelegter Probenlösung vermengt und nach 5 min bei 595 nm vermessen. Die Konzentration der Proteinlösung errechnete sich aus einer bei der Messung mitgeführten Standardreihe.

Homogenisationspuffer 2x:

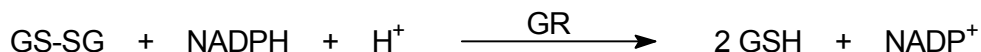
Saccharose	0,5 M
HEPES	40 mM
EDTA	2 mM
pH 7,0 mit	NaOH

4.5.12 Glutathionperoxidase -Aktivitätsbestimmung

Peroxide (R-OOH) können von Glutathionperoxidase (GPx) Glutathion-abhängig (GSH) zu ihren Alkoholen reduziert werden.



Das entstandene oxidierte Glutathion (GS-SG) kann unter Verbrauch von NADPH durch die Glutathionreduktase (GR) wieder zu GSH reduziert werden.



Dieses enzymatische System kann *in vitro* nachgestellt werden (Flohe and Gunzler, 1984), wobei dem gekoppelten System außer dem Analyten (GPx) alle Reaktionspartner im Überschuss zugegeben werden. Der Verbrauch an NADPH ist somit proportional zur probeneigenen GPx-Aktivität.

Zur Messung wurden in eine Küvette ca. 100 µl Zytosol-Fraktion (ca. 20 µg Protein) vorgelegt, auf 500 µl mit ddH₂O aufgefüllt und mit 500 µl Reaktionsmix versetzt. Die Lösung wurde für ca. 5 min raumtemperiert, bevor durch Zugabe des Peroxid-Substrates (10 µl 0,07%iges tert-Butyl-Hydroperoxid) die Reaktion gestartet wurde. Die Abnahme des NADPH wurde bei 340 nm gemessen (4 Messpunkte im Abstand von 10 s).

GPx-Reaktionsmix pH 8,0:

Tris	0,2 M
EDTA	1 mM
NADPH	0,33 mg/ml
GSH	1,42 mg/ml
GR	2 U/ml

Die GPx-Aktivität wurde in Anlehnung an das Lambert-Beer'sche-Gesetz unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten für NADPH wie nachstehend berechnet:

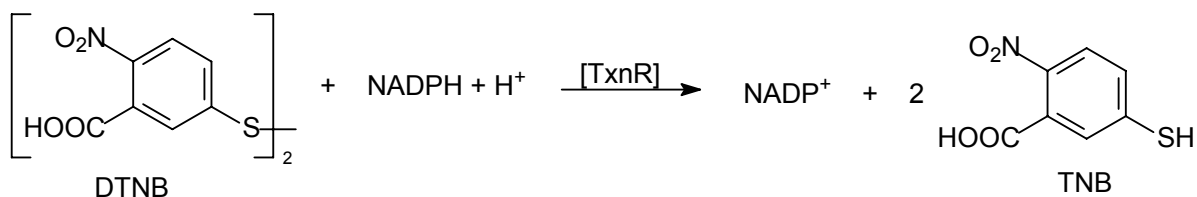
$$\frac{\text{GPx - Aktivität}}{[\text{nmol} * \text{min}^{-1} * \text{mg}^{-1}]} = \frac{\Delta E_{340} / \text{min} * V_{\text{Ansatz}} [\text{l}]}{\epsilon_{340} [\text{M}^{-1} * \text{cm}^{-1}] * d [\text{cm}] * m_{\text{Protein}} [\text{mg}]}$$

ΔE_{340}	Extinktionsänderung bei 340 nm [min^{-1}]
ϵ_{340}	molarer Extinktionskoeffizient für NADPH+H ⁺ ($\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6200 \text{ M}^{-1} * \text{cm}^{-1}$)
V_{Ansatz}	Gesamtansatzvolumen (1 ml)
m_{Protein}	Protein pro Ansatz [mg]
d	Küvettdurchmesser (1 cm)

Zur Bestimmung des NADPH-Abbaus, unabhängig von der GPx-Aktivität in der Probe, wurde parallel ein mit 100 µl Mercaptosuccinat (15 mg/ml) gehemmter Ansatz gemessen. Dieser intrinsische NADPH-Abbau wurde in der Berechnung der Enzymaktivität berücksichtigt.

4.5.13 Thioedoxinreduktase-Aktivitätsbestimmung

Die TxnRd ist eine Disulfidreduktase. Durch Reduktion von Ellman's Reagenz (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure); DTNB) kann auf die Aktivität der TxnRd geschlossen werden (Hill, et al., 1997). Gemessen (412 nm) wird das Sulfid (5-Thio-2-nitrobenzoesäure; TNB), welches unter NADPH-Verbrauch gebildet wird.



In einer Küvette wurden 900 µl Reaktionsmix vorgelegt, mit ddH₂O abzüglich des Volumens des Analyten auf 1 ml aufgefüllt und für 3 min bei RT temperiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe der zu messenden Zytosol-Fraktion (ca. 20 µg Protein) gestartet und bei 412 nm vermessen. Die Menge an zugeführtem Protein sollte so bemessen sein, dass der Anstieg (ΔE/min) der Absorption über den Messzeitraum (3 min) relativ konstant bleibt.

Reaktionsmix:

Kaliumphosphat Puffer pH 7,0	100 mM
DTNB	2 mg/ml
EDTA	10 mM
NADPH	0,2 mg/ml
BSA	0,2 mg/ml

Die TxnRd-Aktivität wurde unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten von TNB mit folgender Formel berechnet. Es ist zu beachten, dass beim Abbau von einem DTNB zwei TNB-Moleküle entstehen.

$$\frac{\text{TxnRd - Aktivität}}{[\text{nmol} * \text{min}^{-1} * \text{mg}^{-1}]} = \frac{\Delta E_{412} / \text{min} * V_{\text{Ansatz}} [\text{l}]}{\epsilon_{412} [\text{M}^{-1} * \text{cm}^{-1}] * d [\text{cm}] * m_{\text{Protein}} [\text{mg}] * 2}$$

ΔE ₃₄₀	Extinktionsänderung bei 412 nm, [min ⁻¹]
ε ₃₄₀	molarer Extinktionskoeffizient für TNB (ε _{412 nm} = 13600 M ⁻¹ * cm ⁻¹)
V _{Ansatz}	Gesamtansatzvolumen (1 ml)
m _{Protein}	Protein pro Ansatz [mg]
d	Küvettendurchmesser (1 cm)

4.5.14 Messung proinflammatorischer Zytokine

Die Multiplex/Lincoplex-Methode basiert auf der konventionellen Sandwich-Assay-ELISA-Technologie, bei der mehrere Zytokine gleichzeitig bestimmt werden können. Das Antigen wurde zum einen von einem biotinylierten Antikörper gebunden, zum anderen von einem Antikörper, welcher kovalent an einzelne Kügelchen gebunden war. Abhängig vom Antikörper waren die Kügelchen durch Fluoreszenzfarbstoffe markiert. Bei der Detektion im Doppellaser-System konnte auf Qualität wie auch auf Quantität der einzelnen Zytokine geschlossen werden.

Für die Bestimmung von $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-1 β und INF γ fand der Lincoplex Cytokine Immunoassay Kit (Linco Research Inc., St. Charles, MO, USA) Verwendung. Den Angaben der Hersteller folgend wurden jeweils 50 μl Serum von $\text{APC}^{\text{Min/+}}$ - bzw. $\text{APC}^{\text{Min/+}}/\text{SePP}^{\text{+/-}}$ -Tieren im Luminex 200 (Luminex, Austin, TX, USA) vermessen.

4.6 Selenbestimmung

Die Selenbestimmung basierte auf der fluorimetrischen Eigenschaft von 2,3-Diaminonaphthalin (DAN) im Komplex mit $\text{Se}^{(+\text{IV})}$ (Sheehan and Gao, 1990).

Zunächst wurden alle Selenverbindungen durch Aufschließen in 500 μl einer Säuremischung (4 Teile 70 %ige HNO_3 und 1 Teil 70 %ige HClO_4) bei 190 $^\circ\text{C}$ (2 h) einheitlich in die höchste Oxidationsstufe ($\text{Se}^{+\text{VI}}$) überführt. Nach Abkühlen auf RT wurden 500 μl 37 %ige HCl zugegeben und sukzessive erhitzt (von 90 $^\circ\text{C}$ auf 150 $^\circ\text{C}$). Hierbei wurde $\text{Se}^{(+\text{VI})}$ zu $\text{Se}^{(+\text{IV})}$ reduziert, zusätzlich wurden Nitrosegase entfernt, bis nach ca. 30 min bei 150 $^\circ\text{C}$ keine braunen NO_x -Gase mehr aufstiegen. Der Ansatz wurde abgekühlt und nach Zugabe von 2 ml EDTA (2,5 mM, pH 8,0), 600 μl DAN (1 mg DAN / ml 0,1 M HCl) sowie Temperieren im Wasserbad (55 $^\circ\text{C}$, 30 min) konnte $\text{Se}^{(+\text{IV})}$ als Piazselenol komplexiert werden. Bei RT wurde der Komplex mit 1000 μl Cyclohexan ausgeschüttelt. Es wurden jeweils 600 μl Cyclohexanphase im Fluorimeter (LS50B, Perkin-Elmer, Boston, USA) bei einer Anregungswellenlänge von 364 nm und einer Emission bei 520 nm vermessen. Die Analyse erfolgte im Duplikat und wurde von einer Standardreihe bekannter Natriumselenitkonzentration begleitet.

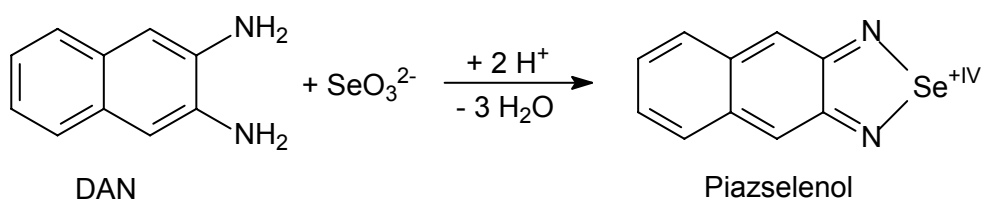


Abbildung 4.3: Bildung von Piazselenol: Selen (+IV) wird im sauren Milieu von 2,3-Diaminonaphthalin (DAN) gebunden. Das gebildete unpolare Piazselenol kann mit UV-Licht (364 nm) angeregt werden, wobei es bei 520 nm emittiert. Diese fluorimetrische Eigenheit ist Grundlage der hier zur Anwendung gekommenen Selenbestimmung.

4.7 Statistische Auswertung

Die in dieser Arbeit aufgeführten Werte in Graphiken sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (eng. Standard error of the mean, SEM) aufgeführt.

Die Vorgehensweise in der Statistischen Auswertung wurde mit Dr. K. Neumann (Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie, Charité, Berlin) beraten. Wenn nicht anders aufgeführt, wurde der nicht gepaarte, zweiseitige Student's t-Test angewendet (Software, GraphPad Prism 5.). Hierbei wurden die ermittelten p-Werte wie folgt titulierte: $p > \text{n.s.}$ (nicht signifikant), $p < 0,1^+$, $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$.

5 Ergebnisse

5.1. SePP-Expression in Colonkarzinom-Zelllinien

Aus früheren Untersuchungen war bekannt, dass intestinale Tumore kein oder nur geringe Mengen an Selenoprotein P produzieren (Al-Taie, et al., 2004). Dabei stellte sich die Frage, ob die fehlende Expression genomische oder transkriptionelle Ursachen hat. Weitergehend war von Interesse, ob durch Selen-Substitution die Menge an gebildetem SePP erhöht werden kann, was eine Redifferenzierung bzw. ein vermindertes Wachstum der Tumorzelle zur Folge haben könnte.

Diese initiale Fragestellung sollte in Zellkulturversuchen beantwortet werden. Die hierzu verwendeten Zelllinien HT29, LIM1215 und HCT116 wurden ursprünglich aus humanen Colonkarzinoma kultiviert (Morin, et al., 1996; Ramsay, et al., 2005; Santoro and Groden, 1997; Whitehead, et al., 1985). Die Selen-Supplementation erfolgte mit Selenit.

Die Zellen wurden in DMEM-Medium gehalten und bei Konfluenz als Duplikate in Flaschen mit je 0 nM, 10 nM, 50 nM und 100 nM Na-Selenit im Medium aufgeteilt.

Die verschiedenen Selen-Konzentrationen hatten keine erkennbaren morphologischen Veränderungen der Zellen zur Folge. Auch konnte kein Einfluss auf das Wachstum und die Teilungsrate festgestellt werden.

Da es sich bei SePP um ein sezerniertes Protein handelt, wurde zum einen das Zellkulturmedium (aufkonzentriert durch Acetonfällung), zum anderen das Zelllysate auf SePP-Produktion untersucht. SePP konnte jedoch mittels SDS-PAGE und anschließender Western Blot-Analyse weder im Zelllysate noch im Zellmedium nachgewiesen werden. Auch die verschiedenen Selen-Konzentrationen im Medium hatten keinen Einfluss auf die Produktion des Proteins. In den nachfolgenden Analysen lag der Fokus daher auf der genomischen Ebene.

Aus einem Teil der Zellen des Zellkulturversuches wurde durch GTC-Extraktion RNA gewonnen. Diese wurde im denaturierenden Formaldehydgel aufgetrennt (je 30 µg RNA + Leber-RNA als Positiv-Kontrolle) und im Northern Blot analysiert. Sukzessive wurde die Membran mit P³²-markierter SePP-, GPx2- und GPx1-cDNA hybridisiert (siehe Abbildung 5.1).

Im Vergleich zur Leberkontrolle war kein SePP-Transkript in den Zelllinien nachzuweisen. Hingegen konnte eine Produktion von GPx2-mRNA gezeigt werden. Die Zelllinie HT29 bildete deutlich mehr GPx2-Transkripte als HCT116 und LIM1215. Vergleicht man die GPx1-Transkriptmenge, kehrt sich die Reihenfolge um: LIM1215 produzierte deutlich mehr GPx1-mRNA als HCT116, in HT29 war das Transkript kaum noch nachweisbar.

Im Vergleich der verschiedenen Selenit-Konzentrationen war kein deutlicher Trend ersichtlich. Nur HT29 zeigte eine Verringerung an GPx2-Transkript von 10 zu 100 nM Selenit (siehe Abbildung 5.1d).

Die fehlende GPx2-Produktion in der Leber-Kontrolle entsprach den Erwartungen. Verglichen mit der Leberkontrolle war in allen Zelllinien deutlich weniger GPx1-Transkript nachweisbar.

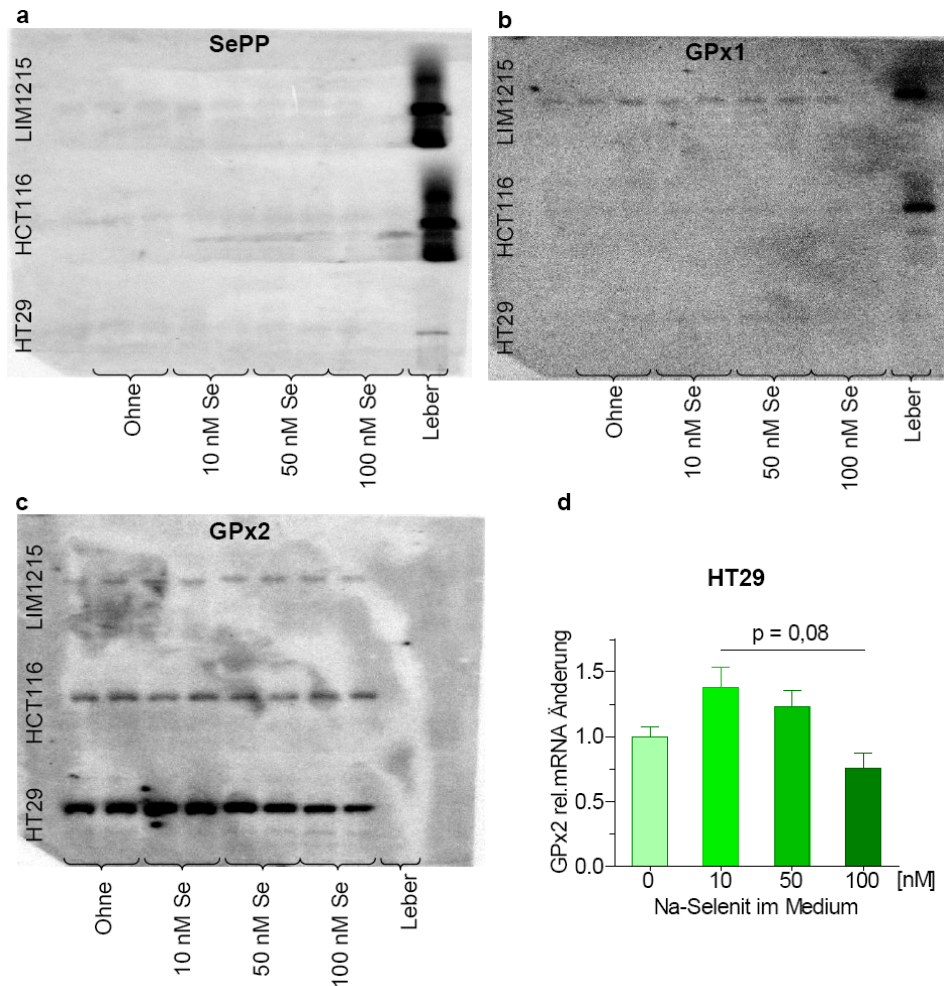


Abbildung 5.1: Selenoprotein-Expression in Colonkarzinom-Zelllinien: Die Zelllinien HT29, HCT116 und LIM1215 wurden in Serum (DMEM-Medium) mit verschiedenen Selen-Konzentrationen (0 nM, 10 nM, 50 nM und 100 nM Na-Selenit) für 7 Tage kultiviert. Die hieraus isolierte RNA wurde im Northern Blot analysiert, wobei sukzessive mit SePP- (a), GPx1- (b) und GPx2-Sonden (c) hybridisiert wurde. Als Positiv- (für: SePP, GPx1) bzw. Negativkontrolle (für: GPx2) wurde Leber-RNA mitgeführt. Die GPx2-mRNA-Änderung in HT29-Zellen bei Behandlung mit Selenit wurde in (d) graphisch veranschaulicht (zweiseitig, ungepaarter, t-Test).

Auf genomischer Ebene konnte SePP mittels PCR in den untersuchten Colonkarzinom-Zelllinien HT29, HCT116 und LIM1215 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5.2).

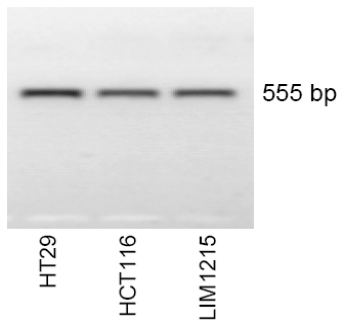


Abbildung 5.2: Test auf SePP-DNA in humanen Darmkrebszelllinien: Das Vorhandensein des SePP-Allels wurde in den Zelllinien HT29, HCT116, und LIM1215 getestet. Hierzu wurde die DNA mittels Glasmilch extrahiert und Fragmente des SePP-Gens mittels SePP-spezifischen Primern (FKOLZ2, Rev-mSEPP02, Chrom 15: 3,224,303 - 3,224,858 Bp) amplifiziert.

5.2. SePP- und GPx2-mRNA in Tumoren aus APCmin-Mäusen

Anders als beim Menschen, entstehen Tumore im APCmin-Modell überwiegend im Dünndarm. In einem Vorversuch stand die Frage im Vordergrund, ob sich APCmin-Tumore ähnlich wie humane Colontumore in ihrer Selenoprotein-Expression verhalten. Aus der Literatur (Al-Taie, et al., 2004) und aus Vorversuchen (siehe Abbildung 5.3) war bekannt, dass SePP-mRNA im Colontumor vermindert exprimiert wird. Ein zweites Selenoprotein, welches mit intestinalen Tumoren assoziiert wird, ist die GPx2. Dieses Protein ist im Colontumor tendenziell verstärkt exprimiert (Brigelius-Flohe, 2006; ; Mork, et al., 2000).

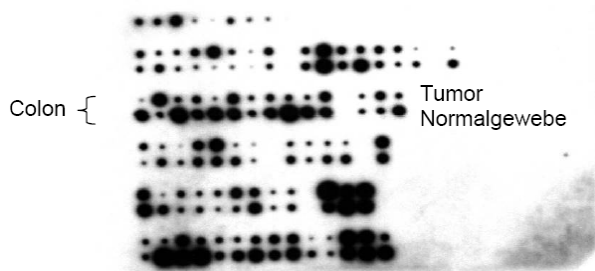


Abbildung 5.3: SePP-Expression in humanem Tumorgewebe: Gewebe-Blot mit Tumorproben (jeweils die obere Reihe) und benachbartem Normalgewebe (jeweils die untere Reihe) verschiedener Organe. Es wurde mit P³²-markierter hSePP-Sonde hybridisiert (freundlicherweise von Dr. Lutz Schomburg zur Verfügung gestellt). Im Falle des Colons wird deutlich, dass SePP in Tumoren geringer exprimiert ist als im umliegenden gesunden Gewebe.

Um die SePP und GPx2-Expressionsmuster im APCmin-Tumor zu bestätigen, wurde der Ansatz des Northern Blot gewählt. Hierzu wurde RNA aus Tumoren frischen Darmgewebes einer APC^{Min/+}-Maus präpariert. Aufgrund der

geringen Tumorgroße (Durchmesser 1-2 mm) wurden je Ansatz zwei bis vier Tumore gepoolt. Als vergleichendes Gewebe wurde umliegendes Darmepithel verwendet.

Es wurden jeweils P^{32} -markierte Sonden der beiden zu untersuchenden Gene hergestellt und sukzessive auf dem Northern Blot hybridisiert. Durch „Strippen“ der Membran (0,5 h, 0,5 % SDS, 80 °C) konnte diese mehrmals hybridisiert werden. Zur Normalisierung der Proben wurde β -Actin als konstitutiv exprimiertes Gen verwendet. Statistische Relevanz wurde mit dem Student's t-Test (zweiseitig, ungepaart) festgestellt.

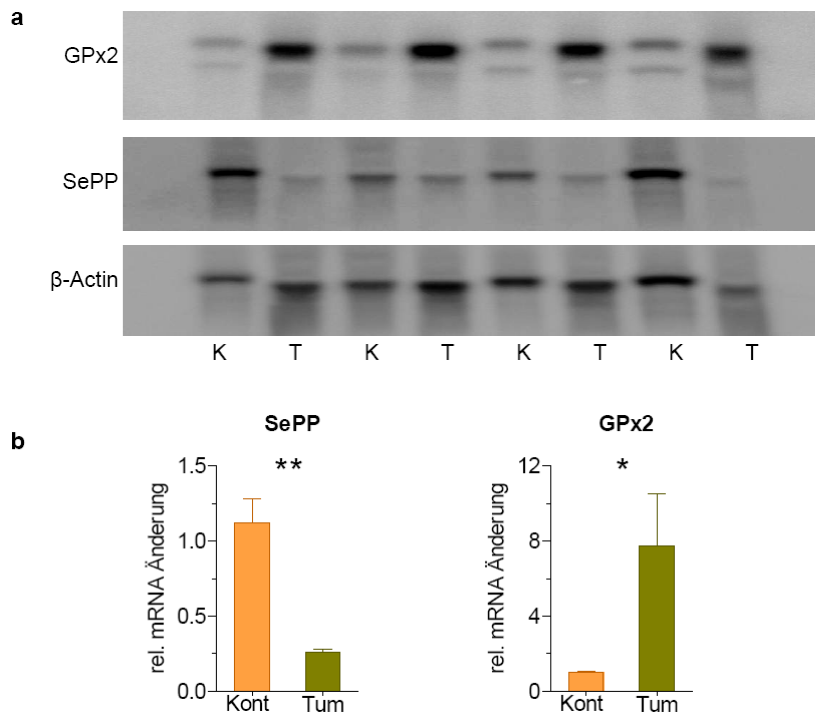


Abbildung 5.4: Selenoprotein-Expression in APCmin-Tumoren: Aus 120 Tage alten APC^{Min/+}-Mäusen wurden Tumore (T) wie auch umliegendes nicht neoplastisches Darmepithel (K) isoliert. Die mittels GTC-Methode extrahierte RNA wurde im Northern Blot sukzessive mit SePP-, GPx2- und β -Actin-Sonde hybridisiert (a). Zur Normalisierung wurden die Signalstärken von SePP- und GPx2 auf das konstitutive exprimierte β -Actin normalisiert. Die Änderung der mRNA-Menge von Tumorgewebe (Tum), verglichen mit Kontrollgewebe (Kont), ist in (b) veranschaulicht (zweiseitiger, ungepaarter t-Test). Im Falle von SePP ist eine Reduktion der mRNA-Menge auf 0,23 (**, p < 0,01) im Tumor zu verzeichnen. Hingegen ist GPx2 im Tumor 7,8-fach (*, p < 0,05) exprimiert.

Zusammenfassend zeigte sich, dass im Tumor die mRNA-Expression von SePP gegenläufig zu der von GPx2 war. Die SePP-mRNA-Expression war um den Faktor 5 niedriger, während die Menge an GPx2-mRNA-Expression um das 6-fache höher als im Kontrollgewebe war. So offenbarte sich trotz unterschiedlicher Spezies und Lokalisation der Tumore ein ähnliches Expressionsmuster und unterstrich damit die geeignete Wahl des murinen Tumormodells, um den Selenmetabolismus im Darmkrebs des Menschen nachzustellen.

5.3. Charakterisierung der Tumore aus SePP x APCmin-Mäusen

Der Hauptteil dieser Arbeit befasste sich mit den Auswirkungen der SePP-Inaktivierung auf das Tumorstadium. Hierzu wurde ein *in vivo*-Ansatz gewählt, bei dem das etablierte Mausmodell APCmin mit der SePP-Maus verkreuzt wurde.

Bei der APCmin-Maus handelt es sich um ein Tumormodell, welches spontan multiple intestinale Neoplasien (min) entwickelt. Diese erhöhte Tumorzinzidenz wurde bei allen Tieren beobachtet, wenn diese mit einer vorzeitigen Stoppmutation in einem der beiden APC-Allele vorbelastet waren (Moser, et al., 1990; ; Su, et al., 1992) und (Luongo, et al., 1993).

5.3.1. Versuchsaufbau

APC^{Min/+}/SePP^{+/-}-Tiere zeigten in einem Alter von unter 80-90 Tagen keine unmittelbaren Beeinträchtigungen der Fruchtbarkeit oder des allgemeinen Gesundheitszustandes. Deswegen wurde der nachstehende Verpaarungsansatz gewählt:

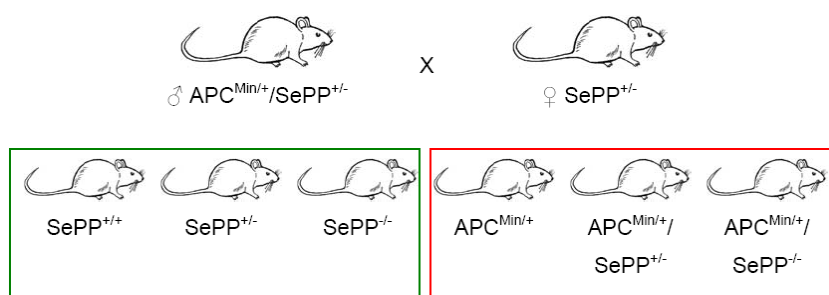


Abbildung 5.5: Verpaarungsansatz der SePP x APCmin-Zucht: Das APCmin-Allel wurde aus praktischen Erwägungen paternal vererbt. Dieser Ansatz ermöglichte eine mehrfache Verpaarung während einer Generation. Die hieraus resultierenden rotmarkierten Tiere wurden für die Untersuchungen des Tumorstadiums verwendet, die grünmarkierten Mäuse fanden Eingang in die Aktivitätsbestimmung der selenabhängigen Enzyme im Intestinaltrakt.

Aus praktischen Erwägungen wurde das Min-Allel zumeist durch den Vater vererbt. Bei Weitergabe des Min-Allels über die Mutter (Fertilität ab ca. 2 Monate) könnte wegen der Tragzeit von 21 Tagen und der folgenden Stillzeit nur eine Verpaarung pro Tier erfolgen. Zudem wäre die Schwangerschaft und anschließende Aufzucht der Nachkommen eine zusätzliche Belastung und damit ein weiterer Einflussparameter zu der einsetzenden Tumorigenese.

Die hieraus entstehende theoretische Verteilung nach Mendel spiegelte sich in der Zucht wieder. Ein embryonal-letaler Einfluss einer der genetischen Kombinationen von SePP x APCmin konnte nicht beobachtet werden.

In einem Alter von 120 Tagen wurden die Tiere durch CO₂-Inhalation getötet. Generell war eine deutliche Gewichtsreduktion der durch Krebs betroffenen Tiere gegenüber den Tieren ohne Min-Allel zu verzeichnen. Diese war bei den Männchen ausgeprägter als bei den Weibchen (Gewichtsreduktion bei Männchen: 21 %, $p=0,00001$; Gewichtsreduktion bei Weibchen: 11%, $p = 0,07$). Hierbei spielte es keine Rolle, ob die Maus heterozygot für SePP oder Wildtyp war.

Ein weiteres Merkmal der durch Krebs belasteten Tiere war eine Anämie. Im nach der Gerinnung (ca. 30 min, RT) zentrifugierten Blut war das Verhältnis deutlich zugunsten des Serumanteils verschoben. Dieser niedrige Hämatokrit war gepaart mit einer Splenomegalie. Das Volumen der Milz war augenscheinlich um das Drei- bis Fünffache vergrößert.

5.3.2. Charakterisierung der Tumore

Anders als beim Menschen hat ein verändertes APC-Gen in der Maus vor allem Auswirkungen auf das Tumorgehen im Dünndarm. Das Hauptaugenmerk ruhte also auf diesem Teil des intestinalen Verdauungstraktes. Der Magen wie auch das Caecum zeigten keine Anzeichen neoplastischer Veränderungen.

Unbehandelt war der Darm zu fragil für die Handhabung. Auch war der Kontrast zwischen Tumor und normalem Gewebe ungenügend. Zugunsten der besseren Prozessierbarkeit war es notwendig, die Gedärme mit Formaldehyd zu fixieren. Durch Färbung mit Methylenblau konnte der Kontrast soweit erhöht werden, dass auch kleine Neubildungen von den normalen Darmzotten unterschieden werden konnten.

Der Dünndarm wurde in drei gleichgroße Stücke, eine proximale (DüDa I), eine mittlere (DüDa II) und eine distale Sektion (DüDa III), unterteilt. Der Dickdarm wurde nicht differenziert (siehe Abbildung 4.2). Zur Analyse kamen elf APC^{Min/+}- und (n = 13) APC^{Min/+}/SePP^{+/-}-Tiere (n = 13). Die Tumorzählung erfolgte durch zwei Wissenschaftler unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops (7x - 10x Vergrößerung, Olympus SZ40, Hamburg) mit Durchsichtbeleuchtung. Abbildung 5.6 zeigt zwei exemplarische Paare von Darmpräparaten, jeweils aus einem APC^{Min/+}- und einem APC^{Min/+}/SePP^{+/-}-Tier des gleichen Wurfs. Die einzelnen Tumore waren deutlich als punktuelle Strukturen erkennbar. Morphologisch waren Tumore des Dünns- und des Dickdarms deutlich verschieden. Neubildungen im Dünndarm waren von planarer Struktur, hingegen erschienen Colontumore globulär.

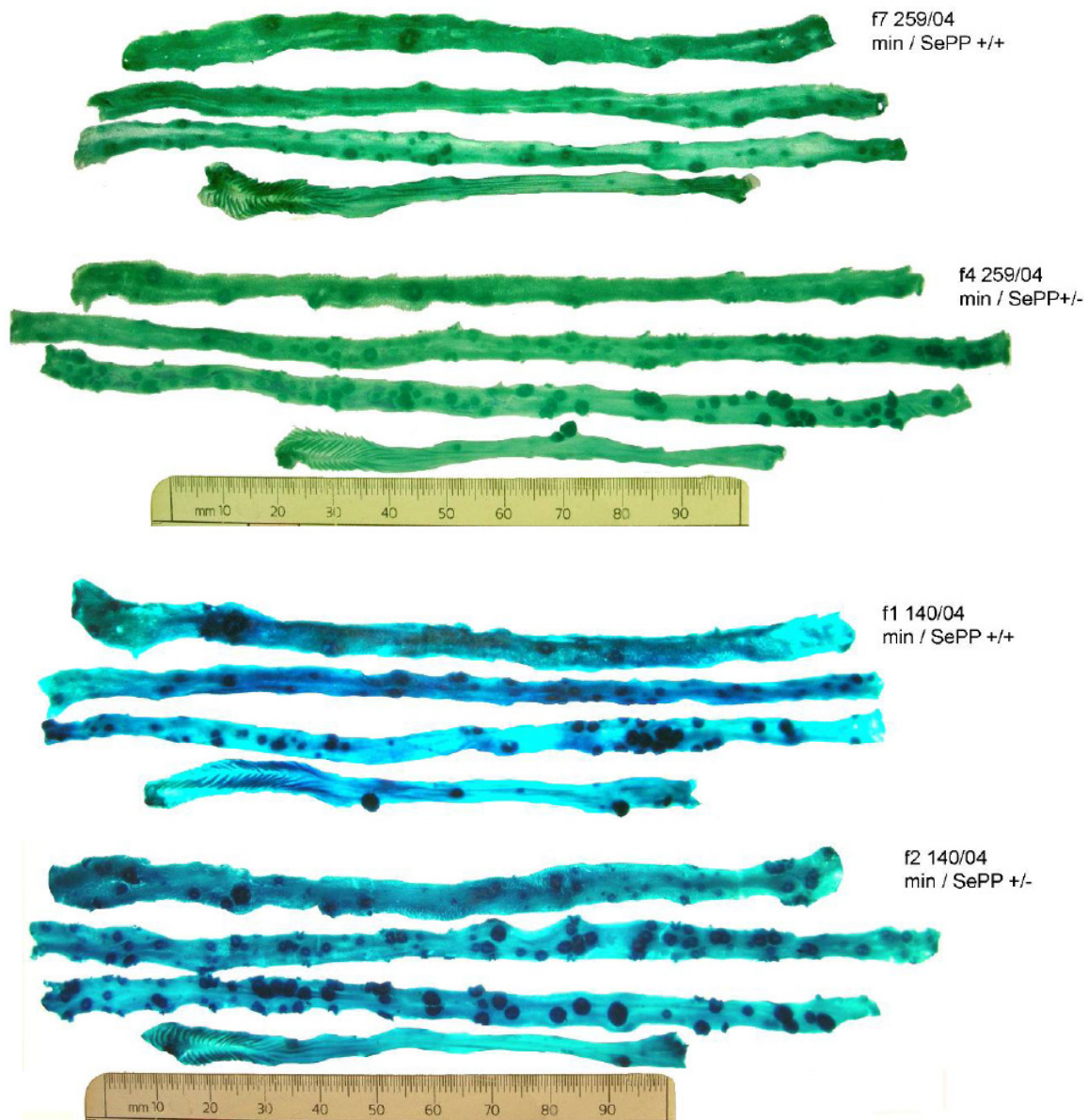


Abbildung 5.6: Darmpräparate von $APC^{Min/+}$ - und $APC^{Min/+}/SePP^{+/-}$ -Mäusen: Dargestellt ist jeweils der Verdauungstrakt einer $APC^{Min/+}$ - und $APC^{Min/+}/SePP^{+/-}$ -Maus desselben Wurfs. In den beiden exemplarischen Beispielen wird die Abhängigkeit der Tumoranzahl vom SePP-Genotyp deutlich. Zusätzlich kann auf eine Zunahme der Tumorzinzenz von proximal zu distal innerhalb eines Individuums hingewiesen werden.

Der intestinale Verdauungstrakt von 120 Tage alten Mäusen wurde mit Formaldehyd fixiert und mit Methyleneblau gefärbt.

Exemplarisch sind Därme aus $APC^{Min/+}$ - und $APC^{Min/+}/SePP^{+/-}$ -Tiere des jeweils selben Wurfs dargestellt. $APC^{Min/+}/SePP^{+/-}$ haben augenscheinlich mehr und größere Tumore. Vergleiche verschiedener Würfe zeigen unterschiedlich starke Tumorresponsivität innerhalb eines Genotyps.

Die Tumore im Colon waren, verglichen mit denen des Dünndarms, wesentlich größer. Auf die Tumorzahligkeit im Colon hatte die Deletion eines SePP-Allels keinen Einfluss (im Mittel: $APC^{Min/+}$: 3,2 Tumore; $APC^{Min/+}/SePP^{+/-}$: 2,8 Tumore; $p = 0,7$).

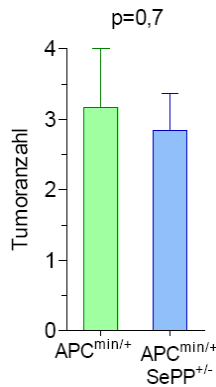


Abbildung 5.7: Tumoranahl im Dickdarm: In $APC^{min/+}$ - ($n = 12$) und $APC^{min/+}/SePP^{+/-}$ - ($n = 13$) Mäusen ist kein Genotyp-spezifischer Einfluss auf die Tumorzahligkeit im Dickdarm festzustellen (zweiseitig, ungepaarter t-Test).

Über 90 % aller Tumore entstanden im Dünndarm der Mäuse. Hier war ein SePP-Genotyp-spezifischer Einfluss auf die Tumorzahligkeit ersichtlich. Eine $APC^{Min/+}$ -Maus hatte durchschnittlich 96 Tumore (SEM: ± 10 , $n = 13$). Hingegen waren im statistischen Mittel 134 Tumore (SEM: ± 14 , $n = 13$) in Tieren zu finden, die nur ein funktionelles SePP-Allel hatten. Dies entsprach einem Anstieg von 39 % ($p < 0,05$).

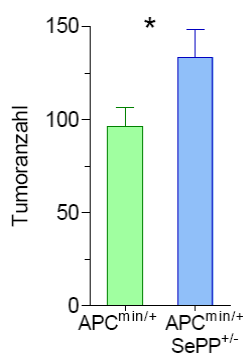


Abbildung 5.8: Tumoranahl im Dünndarm: Beim Vergleich von $APC^{min/+}$ - ($n = 13$) und $APC^{min/+}/SePP^{+/-}$ -Mäusen ($n = 13$) ist ein deutlicher Einfluss von SePP in Dünndarmpräparaten festzustellen. SePP-heterozygote Tiere erkrankten im APCmin-Modell 1,4-mal (*, $p < 0,05$; zweiseitig, ungepaarter t-Test) häufiger an Dünndarmtumoren.

Neben dem SePP-spezifischen Einfluss auf die Tumorzahligkeit im Dünndarm war eine zusätzliche EinflussgröÙe festzustellen. Durch Differenzierung der Tumoranahl nach dem Entstehungsort konnte eine deutliche Zunahme von proximal zu distal, unabhängig vom Genotyp, ermittelt werden (siehe Abbildung 5.9).

Es ist anzumerken, dass im DüDa I ein Großteil der Tumorlast auf den Bereich des Duodenums (die vorderen 3 - 4 cm vom DüDa I) beschränkt war. Diese Tumore waren überdurchschnittlich groß (Durchmesser 3 - 6 mm). Hierbei konnte in diesem Bereich keine besondere zahlenmäßige Häufung in Abhängigkeit vom SePP-Genotyp festgestellt werden.

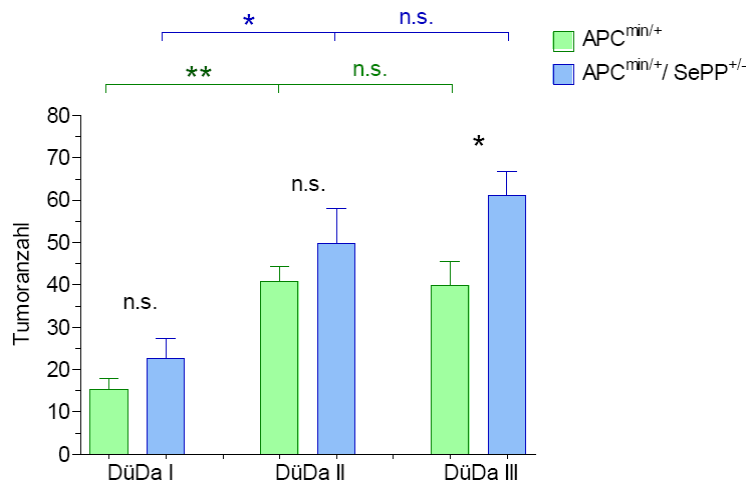


Abbildung 5.9: Tumoranahl in den einzelnen Dünndarmabschnitten: Es wurde die Tumorzinzidenz in den einzelnen Dünndarmabschnitten (proximal zu distal: DüDa I, DüDa II, DüDa III) in Abhängigkeit des Genotyps (APC^{Min/+}, n = 13; APC^{Min/+}/SePP^{+/-}, n = 13) dargestellt. Eine Interpretation der Daten erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (eng. One-way analysis of variance, One-way ANOVA) gefolgt von einem Bonferroni's multiplen Vergleichstest (*, p < 0,05; **, p < 0,01; n.s. ≥ 0,05). Innerhalb des Genotyps ist eine tendenzielle Zunahme der Tumorzahligkeit von proximal zu distal zu verzeichnen. Dieser Trend ist in allen Genotypen festzustellen und somit unabhängig vom SePP-Allel. Der SePP-spezifische Einfluss auf die Tumorzinzidenz wird besonders im dritten Dünndarmabschnitt (distalen, DüDa III) deutlich. In den beiden anderen Darmabschnitten ist nur ein Trend zu mehr Tumoren durch Verlust eines SePP-Allels ersichtlich.

Um den Einfluss von SePP nicht nur auf die Tumorzinzidenz zu beschränken, wurde auch die jeweilige GröÙe der Tumore analysiert. Mittels einer Schablone wurde jeder Tumor anhand des Durchmessers in eine von sieben GröÙenkatagorien eingeordnet (S < 0,25 mm; 1 < 0,5 mm; 2 < 1 mm; 3 < 1,5 mm; 4 < 2 mm; 5 < 2,5 mm; 6 < 3 mm; L > 3 mm).

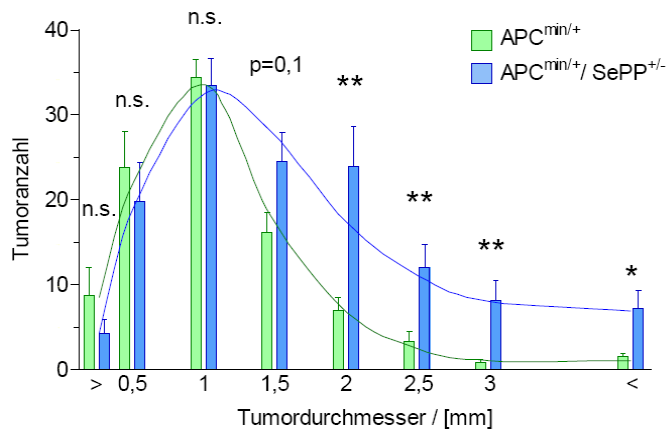


Abbildung 5.10: Tumorgößenverteilung im Dünndarm: In Abhängigkeit vom Genotyp (APC^{Min/+}, n = 13; APC^{Min/+}/SePP^{+/-}, n = 13) sind die Tumore anhand der Größe differenziert (< 0,25 mm; 1 < 0,5 mm; 2 < 1 mm; 3 < 1,5 mm; 4 < 2 mm; 5 < 2,5 mm; 6 < 3 mm; > 3 mm). Ab einem Durchmesser von > 2 mm haben APC^{Min/+}/SePP^{+/-}-Mäuse signifikant mehr Tumore als APC^{Min/+}-Tiere. (*, p < 0,05; **, p < 0,01; n.s. ≥ 0,05; ; zweiseitig, ungepaarter t-Test) Die Veränderung des Tumorspektrums wird durch eine Ausgleichskurve veranschaulicht.

Es wurde eine genotypabhängige Verschiebung des Tumorspektrums deutlich (siehe Abbildung 5.10). APC^{Min}-Tiere mit nur einem funktionellen SePP-Allel hatten die Tendenz, deutlich größere Tumore zu bilden.

Diese Erkenntnis berücksichtigend, konnte die Tumorphäche als Maß der Tumormasse bestimmt werden. Da die Tumore im Dünndarm von eher planarer kreisförmiger Struktur waren (siehe hierfür auch einen histologischen Querschnitt eines Tumors in Abbildung 5.13 und 5.14), wurde deren Ausdehnung mittels der Kreisflächenberechnung ($A = \pi * r^2$) ermittelt.

So war eine Zunahme der Tumorphäche um das 2,9***-fache im APC^{Min}-Tumormodell zu verzeichnen, bei Vorhandensein von nur einem funktionellen SePP-Allel. Differenziert man dieses auf die einzelnen Dünndarmabschnitte, so waren im ersten (DüDa I) und zweiten (DüDa II) Dünndarmabschnitt, abhängig vom Genotyp, eine Verdoppelung der Tumormasse (DüDa I: 1,9-fache und DüDa II: 2,4-fache Induktion) und im letzten Darmteil eine Vervierfachung (DüDa III: 4,1-fache Induktion) festzustellen (siehe Abbildung 5.11).

Beim Vergleich der einzelnen Darmabschnitte innerhalb nur eines Genotyps zeigte sich nur in den Tieren, die heterozygot für SePP waren, eine Zunahme der Tumorphäche von proximal nach distal. Interessanterweise ist die Tumormasse in den „reinen“ APC^{Min}-Tieren in allen Darmabschnitten gleich.

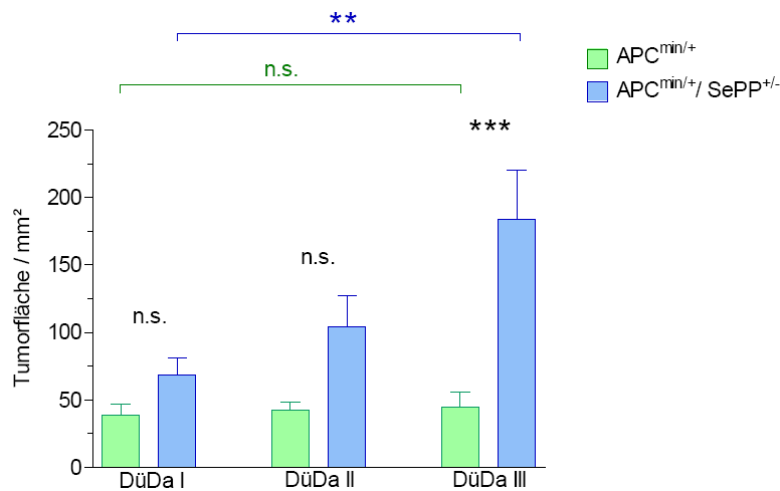


Abbildung 5.11: Tumorfäche in den einzelnen Dünndarmabschnitten: Als Maß für die Tumorlast wurde die tumoröse Fläche in den einzelnen Dünndarmabschnitten (proximal zu distal: DüDa I, DüDa II, DüDa III) berechnet und graphisch dargestellt. Zur Berechnung wurden die einzelnen Tumore der Kreisfläche angenähert. Die statistische Analyse erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (eng. One-way analysis of variance (One-way ANOVA)) gefolgt von einem Bonferroni's multiplen Vergleichstest (**, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; n.s. $\geq 0,05$). Bei den APC^{Min/+}-Tieren ($n = 13$) zeigte sich keine Veränderung der Tumorfäche in den einzelnen Darmabschnitten. Hingegen war in SePP-heterozygoten Tieren (APC^{Min/+}/SePP^{+/-}, $n = 13$) eine deutliche Zunahme der Tumorlast von proximal nach distal ersichtlich.

Im Laufe der Verkreuzung APC^{min} x SePP (siehe Verpaarungsschema, Abbildung 5.5) wurden auch APC^{Min/+}-Tiere geboren, bei denen beide funktionalen SePP-Allele fehlten. Diese SePP-KO-Tiere entwickelten leider einen zunehmend schlechteren Gesundheitszustand und verstarben spontan vor Versuchsende im Zeitraum von ca. 60 Tagen nach der Geburt.

Dies war kein Resultat der verstärkten Tumorbelastung, sondern auf die fehlende Expression von SePP und daher auf einen gestörten Selenmetabolismus und den daraus resultierenden schwerwiegenden Phänotyp zurückzuführen. SePP-KO-Tiere litten an Wachstumsretardierung, gestörter Motorkoordination und epileptischen Anfällen, an denen sie auch verstarben (siehe hierzu auch die Beschreibung des Phänotyps der SePP-Maus in der Einleitung).

In einem einzelnen Fall überlebte ein APC^{Min/+}/SePP^{-/-}-Tier über 60 Tage und konnte zu diesem Zeitpunkt zur Analyse getötet werden. Der Vergleich erfolgte mit einem „reinen“ APC^{Min/+}-Tier des gleichen Wurfs.

Aufgrund des frühen Zeitpunkts der Darmanalyse waren die Tumore nur von kleinem Ausmaß (< 1 mm), jedoch zeigte sich ein deutlicher Einfluss durch den kompletten genetischen Verlust des Selen-Transportproteins. Gegenüber den APC^{Min/+}-Tieren hatte die APC^{Min/+}/SePP^{-/-}-Maus fünfmal mehr Tumore. Auch in diesem Fall war die Zunahme der Tumore von proximal nach distal ersichtlich (siehe Abbildung 5.12).

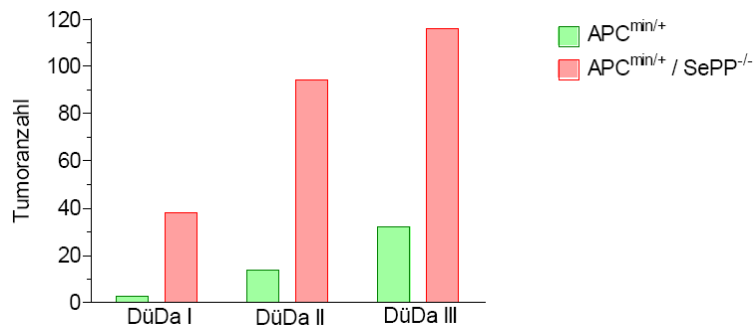


Abbildung 5.12: Tumorzahl im Dünndarm einer APC^{Min/+}- und einer APC^{Min/+}/SePP^{-/-}-Maus. Beispiel von zwei männlichen Tumor-Mäusen desselben Wurfs (APC^{Min/+}, APC^{Min/+}/SePP^{-/-}), welchen im Alter von 60 Tagen der Darm entnommen und präpariert wurde. Der komplette SePP-Verlust führt in den APC^{Min/+}/SePP^{-/-}-Mäusen zu 5,1-fach mehr Tumoren im gesamten Dünndarm, verglichen mit APC^{Min/+}-Tieren. Innerhalb des Darms ist eine Zunahme der Tumorzahl von proximal zu distal (DüDa I, DüDa II, DüDa III), unabhängig von SePP, ersichtlich.

5.3.3. Histopathologische Tumordiagnostik

Die vorangegangenen makroskopischen Untersuchungen zeigten eine genotypische Beeinflussung vor allem im distalen Dünndarm (DüDa III). Dieser Abschnitt wurde den Pathologen PD Dr. Carsten Denkert und PD Dr. Wilko Weichert (Institut für Pathologie der Charité, CCM, Berlin) für die histopathologischen Untersuchungen übergeben. Hierzu wurden die Formaldehyd-fixierten Darmabschnitte zu einer „Swissroll“ geformt, in Paraffin gebettet und als 2 µm-Schnitte Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

In den einzelnen Schnitten waren Neoplasien deutlich von epithelalem Gewebe zu unterscheiden. Im untersuchten Gewebe war ein signifikanter Einfluss der SePP-Deletion ersichtlich. APC^{Min/+}-Tiere hatten im arithmetischen Mittel 10,3 und APC^{Min/+}/SePP^{+/-}-Mäuse 21,6 Tumore. Dies entsprach einer Zunahme um den Faktor 2,1** (siehe hierzu auch Abbildung 5.13).

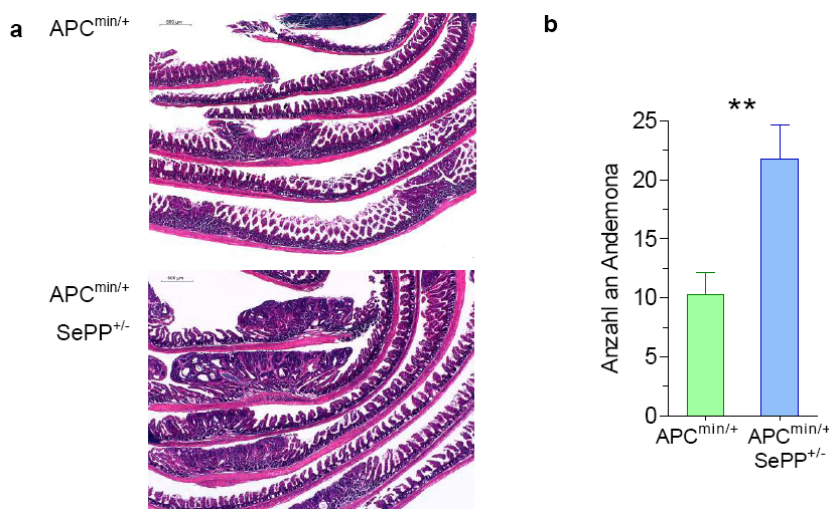


Abbildung 5.13: Histopathologische Auswertung der Darmschnitte: Exemplarisches Beispiel einer „Swissroll“ (a) eines APC^{Min/+}- (oben) und einer APC^{Min/+}/SePP^{+/-}-Maus (unten). Beide Tiere entstammten dem gleichen Wurf. Der Darm (DüDa III) wurde Formaldehyd-fixiert, aufgerollt und in Paraffin gebettet, um 2 µm Schnitte anzufertigen, welche Hämatoxylin-Eosin gefärbt wurden. (b) zeigt die durchschnittliche Tumoranzahl in den einzelnen Schnittpreparaten in Abhängigkeit vom Genotyp ((APC^{Min/+}, n = 11; APC^{Min/+}/SePP^{+/-}, n = 11; **, p < 0,01; zweiseitig, ungepaarter t-Test).

Bei den Tumoren handelte es sich fast ausschließlich um Adenome. In einem Fall konnte auch ein Karzinom (Durchbrechung der Basalmembran) ausgemacht werden. Das betroffene Tier war eine APC^{Min/+}/SePP^{+/-}-Maus.

Insgesamt erschienen die Tumore in APC^{Min/+}/SePP^{+/-}-Mäusen in ihrer Morphologie weniger differenziert und damit maligner. In Abbildung 5.14a ist jeweils ein exemplarisches Beispiel von Tumoren der beiden Genotypen dargestellt.

Um diese Erkenntnis zu untermauern, wurden die Adenome in „gut-“ und „schlecht- differenzierte“ Tumore unterteilt. Hierbei konnte bei den "gut-differenzierten“ Tumoren kein Unterschied in der Häufigkeit zwischen beiden Genotypen ausgemacht werden; hingegen zeigte sich im Falle der „schlecht-differenzierten“ Adenome eine signifikante Zunahme um den Faktor 4,1** (siehe Abbildung 5.14b).

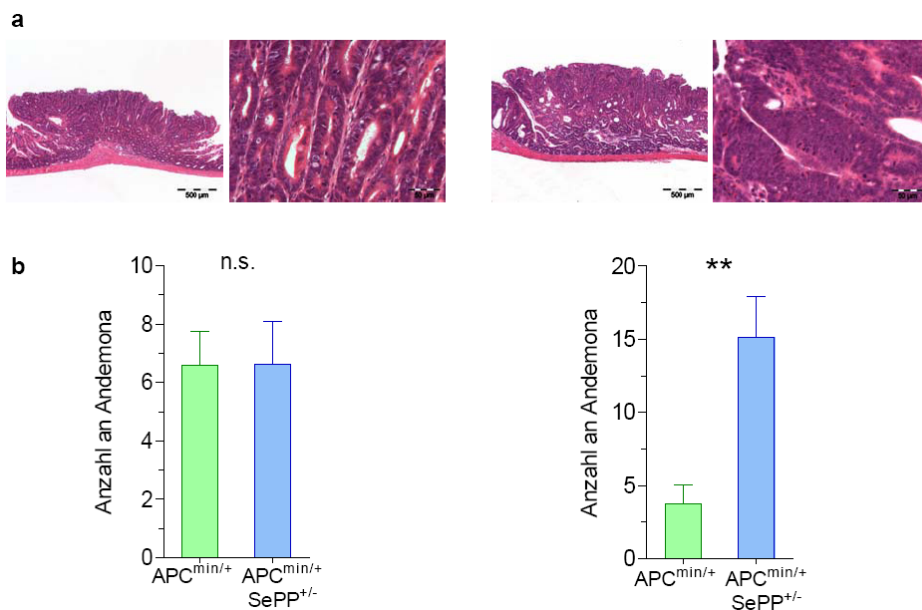


Abbildung 5.14: Differenzierungsgrad der Tumore: Exemplarisches Beispiel (a) eines „gut“ (links) und eines „schlecht“ (rechts) differenzierten Tumors. Die in (b) dargestellte Anzahl der „gut-differenzierten“ Adenome (links) war in beiden Genotypen gleich. Hingegen zeigten APC^{Min/+}/SePP^{+/-}-Mäuse (n = 11) deutlich mehr „schlecht-differenzierte“ Adenome (rechts,) verglichen mit APC^{Min/+}-Kontrolltieren (n = 11). (n.s. ≥ 0,05; **, p < 0,01; zweiseitig, ungepaarter t-Test).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass APCmin-Tumore in SePP-heterozygoten Mäusen häufiger und größer wurden. Zusätzlich ist festzustellen, dass auch die Differenzierung der Tumore weniger ausgeprägt war, was auf ein aggressiveres Tumorwachstum hindeutete.

5.4. Genexpressionsvergleich von SePP^{+/-} - und SePP^{+/+}- Tumoren

5.4.1. RNA-Microarray

Es ist anzunehmen, dass den unter 5.3.2 beschriebenen pathologischen Unterschieden sowie dem scheinbar aggressiveren Wachstum beider genotypspezifischen Tumore charakteristische molekularbiologische Verschiedenheiten zugrunde liegen. Diese sollten sich auch auf transkriptioneller Ebene widerspiegeln. Um diese Veränderungen zu analysieren, wurden RNA-Microarray-Studien durchgeführt, welche Einsicht in nahezu das komplette Transkriptom erlauben.

Jeder intestinale Tumor im APCmin-Modell stellt ein singuläres Ereignis dar. Ausgehend vom dem Kinzler-Vogelstein-Modell führte die fehlende APC-Expression in einer Darmzelle zur neoplastischen Veränderung, welche weitere wachstumsfördernde Mutationen anreichert (somatische Evolution). Um die hierbei auftretenden tumorindividuellen Eigenarten zu minimieren und generelle Unterschiede in der Genexpression eruieren zu können, wurde mit einem Pool gleichartiger Tumore gearbeitet. Zur Verringerung weiterer externer Einflüsse wurden die Tumore aus Tieren des gleichen Wurfs und Geschlechts isoliert. Da die pathologischen Unterschiede im distalen Dünndarmabschnitt (DüDa III) am deutlichsten waren, wurde nur auf Tumore dieses Abschnitts zurückgegriffen.

Der geringe Kontrast im frischen Darmgewebe zwischen normalem Darmepithel und Tumor erlaubte keine saubere Präparation. So erwies es sich als hilfreich, den Darm zuerst in RNase-hemmendem Puffer zu konservieren, um im Anschluss die Tumore zu isolieren. Bei der Präparation wurde darauf geachtet, nur Tumore gleicher Größe zu poolen. Die RNA wurde mittels der GTC-Methode extrahiert und zusätzlich über RNA-Säulen (Qiagen, Hilden) gereinigt. Die Biotinylierung wie auch Hybridisierung auf den Microarray-Chip wurden vom Labor für Funktionelle Genomforschung (LFGF) der Charité, Berlin, (Dr. U. Ungethüm) vorgenommen. Pro Genotyp wurde ein Pool aus 8 bis 10 Tumoren auf jeweils einem RNA-Microarray (GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) hybridisiert. Dieser Chip ermöglichte einen Überblick über 39.000 ESTs, repräsentierte also 45.000 PS.

Die Normalisierung der Signale auf zuerst alle Hybridisierungsereignisse und im Anschluss auf ein Set von „Housekeeping“-Genen wurde vom Service-Zentrum der Charité (Dr. Kuban, LFGF der Charité) durchgeführt.

In einem ersten Schritt konnte von den 45.000 PS annähernd die Hälfte (genau 17.143 PS) ausgeschlossen werden, da in keinem der beiden Genarrays signifikante Signalstärken ($p > 0,05$ in PS) zu verzeichnen waren. Hierbei handelte es sich vorwiegend um gewebeunspezifische Gene, die in den Tumoren nicht in ausreichender Menge detektiert werden konnten und somit vermutlich kaum im Darm exprimiert sind.

Abbildung 5.15 zeigt die Signalintensitäten der nicht normalisierten Probesets gegeneinander aufgetragen. Hierbei wird der große dynamische Bereich deutlich, welcher durch die Hybridisierung abgedeckt wurde.

Die Hybridisierung beider Chips erfolgte in ähnlicher Qualität. Dies lässt sich aus der Steigung von 1,04 der Korrelationsgeraden der Rohdaten (nicht normalisiert) herauslesen. Die Scatterplot-Darstellung veranschaulicht zusätzlich die hohe Ähnlichkeit beider Genprofile.

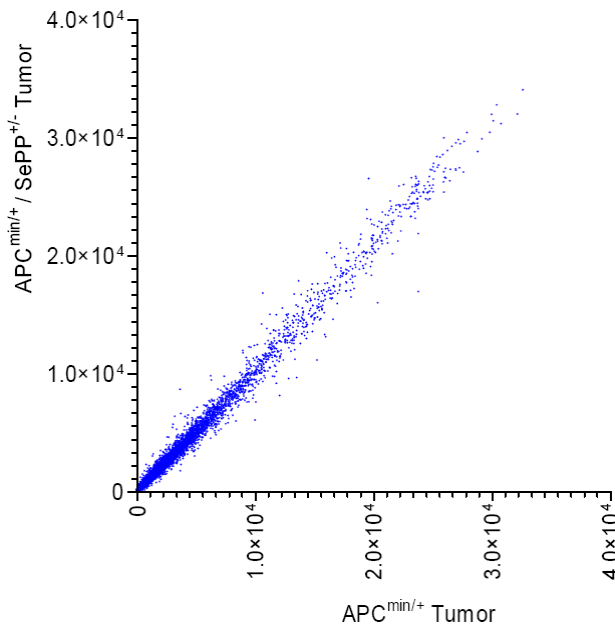


Abbildung 5.15: Scatterplot der Microarrays: Korrelation der nicht normierten Signale der GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Für jedes Hybridisierungsexperiment wurde die RNA aus 8 bis 10 Tumoren gepoolt. Die Scatterplot-Darstellung veranschaulicht, dass beide Hybridisierungen von vergleichbarer Qualität waren.

Diese Ähnlichkeit wird noch deutlicher, wenn man nur die Genexpressionsveränderung graphisch gegeneinander stellt. Abbildung 5.16 zeigt die Expressionsänderung der $APC^{Min/+}/SePP^{+/-}$ gegen die $APC^{Min/+}$ -Tumore. Nur ca. 12 % der Probesets sind mindestens um den Faktor 1,5 unterschiedlich reguliert und nur 4 % sind um mehr als das Doppelte reguliert.

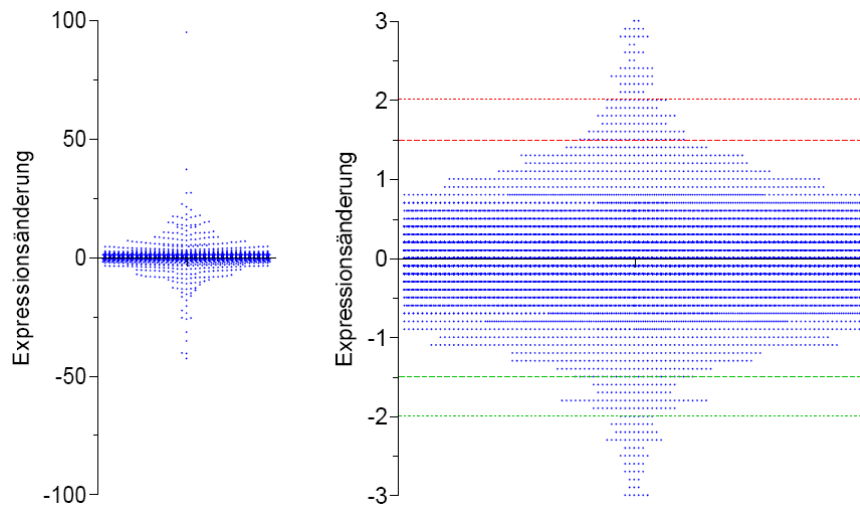


Abbildung 5.16: Spektrum der Expressionsänderung der Tumore in Abhängigkeit von SePP: Die normierten Signalstärken der Genarray-Hybridisierungen wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt. Zur graphischen Auswertung wurden nur die tatsächlich exprimierten Gene verwendet (Detection p-Value < 0,05). Beide Tumorarten ($APC^{Min/+}$, $APC^{Min/+}/SePP^{+/-}$) zeigten nur geringe Expressionsunterschiede. Von den 28.000 exprimierten Proben (PS) sind lediglich 4 % um den Faktor >2 reguliert.

Angeht dessen, dass beide Tumor pools trotz unterschiedlicher Morphologie ein sehr ähnliches Expressionsmuster zeigten, wurde eine Expressionsänderung um mindestens den Faktor 1,5 als Auswahlkriterium zur weiteren Analyse und ggf. Verifikation definiert. So konnten 24.604 Proben sets ausgeschlossen werden. Von den verbliebenen 3354 Proben sets waren im $SePP^{+/-}$ -Tumor pool gegenüber dem Wildtyp-Tumor pool 1769 unter- und 1585 hoch-regulierte Gene zu finden.

Ausgehend von einer intensiven Literaturrecherche wurden aus den verbleibenden Proben sets diejenigen Gene ausgewählt, die vermutlich im Hinblick auf Tumorigenese, Wachstum oder das Spurenelement Selen reguliert waren.

Nachfolgend eine Liste von potentiell in der selenabhängigen Tumorigenese bedeutsamen Kandidaten-Genen mit Literaturangaben:

Tabelle 5.1: Literaturrecherche zu differentiell exprimierten Kandidatengenen aus den Microarray-Analysen: Gene, welche sich im Microarray als reguliert zeigten (Fold change, FC), wurden mittels Literaturrecherche auf ihre Relevanz für die Tumorigenese oder den Selenstoffwechsel untersucht.

FC	Gen	Literatur
12,7	A disintegrin and metallopeptidase domain 21 (Adam21)	(Gavert, et al., 2005)
7,9	Connective tissue growth factor (Ctgf)	(Luo, et al., 2004: ; Paoni, et al., 2003)
6,9	Fibroblast growth factor 17 (Fgf17)	(Nezu, et al., 2005)
3,8	Serum amyloid A 1 (Saa1)	(Gutfeld, et al., 2006)
2,7	Interleukin 6 (Il6)	(Atreya and Neurath, 2005: ; Brozek, et al., 2005)
2,6	Serum amyloid A 2 (Saa2)	(Gutfeld, et al., 2006: ; Paoni, et al., 2003)
2,2	Myeloblastosis oncogene (Myb)	(Biroccio, et al., 2001: ; Ramsay, et al., 2005)
1,9	Bcl2-like 1 (Bcl2l1)	(Paoni, et al., 2003: ; Sulkowski, et al., 2006)
1,8	Mast cell protease 2 (Mcpt2)	(Miller and Pemberton, 2002: ; Norkina, et al., 2004: ; Paoni, et al., 2003)
1,8	Cyclin C (Ccnc)	(Bondi, et al., 2005)
1,7	Cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector A (Cidea)	(Paoni, et al., 2003)
1,7	Carboxypeptidase A3, mast cell (Cpa3)	(Paoni, et al., 2003)
1,6	Angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5 (Ang1)	(Etoh, et al., 2000)
1,6	Jun proto-oncogene related gene d1 (Jund1)	(Behrens, 2000)
1,6	Insulin-like growth factor I receptor	(Durai, et al., 2005), (Sachdev, et al., 2004)
1,5	Mast cell protease 1 (Mcpt1)	(Miller and Pemberton, 2002: ; Paoni, et al., 2003)
1,5	Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)	(Dinkova-Kostova, et al., 2002)
1,5	Peroxisome proliferator activated receptor gamma (Pparg)	(Heikkinen, et al., 2007: ; Paoni, et al., 2003: ; Voutsadakis, 2007)

1,5	Serum amyloid A 3 (Saa3)	(Gutfeld, et al., 2006: ; Paoni, et al., 2003)
1,4	Metallothionein 2 (Mt2)	(Haq, et al., 2003) (Cherian, et al., 2003)
1,4	Metallothionein 1 (Mt1)	(Haq, et al., 2003) (Cherian, et al., 2003)
0,8	Selenoprotein P (SePP)	(Al-Taie, et al., 2004: ; Mork, et al., 2000) (Paoni, et al., 2003)
0,6	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (Timp2)	(Sounni, et al., 2003) (Paoni, et al., 2003)
0,6	Cyclin D binding myb-like transcription factor 1 (Dmtf1)	(Inoue, et al., 2007) (Sreeramaneni, et al., 2005) (Paoni, et al., 2003)
0,6	Claudin 1 (Cldn1)	(Paoni, et al., 2003)
0,6	Procollagen, type IV, alpha 5 (Col4a5)	(Li, et al., 2005)
0,5	Endothelin receptor type B (Ednrb)	(Paoni, et al., 2003)
0,3	Trans-acting transcription factor 4 (Sp4)	(Paoni, et al., 2003)
0,2	Growth differentiation factor 10 (Gdf10)	(Luo, et al., 2004) (Paoni, et al., 2003)

5.4.2. Validierung der Mircoarray-Daten mittels qRT-PCR

Die Expressionsunterschiede der Kandidatengene aus den Genchip-Experimenten wurden mittels qRT-PCR als unabhängige Methode verifiziert. Gegenüber dem robusten und zeitaufwändigen Verfahren des Northern Blot bot sich die quantitative Echtzeit-RT-PCR (Real time-RT-PCR, qRT-PCR) zur Analyse an, da mehrere Transkripte parallel untersucht werden konnten und der Probenbedarf nicht so groß war. Zugleich zeichnet sich diese Technologie durch eine hohe Sensitivität und einen großen dynamischen Messrahmen aus.

Ähnlich der bereits beschriebenen Methode für den Genchip (siehe 5.4.1) wurden fünf weitere Tumorpoole à 8 bis 10 individueller Tumore pro Genotyp erstellt. Um auch Aussagen über nicht-neoplastische Gewebe treffen zu können, wurde zusätzlich normales Darmepithel isoliert (jeweils zwei Pools pro Genotyp). Die extrahierte RNA wurde in cDNA (iScript, Bio-Rad) umgeschrieben und im iCycler (Bio-Rad) amplifiziert. Die hierzu verwendeten Primer (siehe Tabelle 8.1) wurden jeweils für die qRT-PCR optimiert. Die Amplifikationseffizienz mit den ausgewählten Primerpaaren lag bei jeweils deutlich über 70 % der theoretischen 100 %igen Verdopplungsrate pro Zyklus. Da die PCR-Messung SYBR Green-basiert erfolgte, mussten die Amplifikate mittels Schmelzkurven-Analyse auf spezifische Produktbildung analysiert werden. Zusätzlich wurden die PCR-Ansätze mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Hierbei sollte im Falle spezifischer Primer nur eine Produktbande zu sehen und folglich die Intensität des SYBR Green nur auf dieses eine Produkt zurückzuführen sein.

Für die Ermittlung der ΔCt -Werte erwies sich das konstitutiv exprimierte Gen GAPDH als ungenügende Bezugsquelle. Das Tumorgewebe zeigte gegenüber unverändertem Darmepithel eine deutliche erhöhte Produktion dieses Transkripts (siehe Tabelle 5.2).

Hingegen erschien die 18S rRNA als nicht reguliertes Referenztranskript geeignet. Es wurden daher alle ermittelten Ct-Werte auf diesen internen Standard bezogen. Die sich hieraus ergebenden ΔCt -Werte wurden unter Berücksichtigung der Syntheseeffizienz nach der Pfaffl-Methode (REST Version 1.9.12, <http://rest.genequantification.info/>) verglichen.

Die nachfolgende Tabelle listet alle analysierten Gene mit den Signifikanzwerten auf:

Tabelle 5.2: Im Tumor exprimierte Gene in Abhängigkeit vom SePP-Genotyp: Die Tabelle fasst die Ergebnisse der qRT-PCR Verifikationsanalysen zusammen. Hierbei wurde jeweils Tumor-Gewebe ($n = 8$ Pools à 8 bis 10 Tumore) mit nicht-neoplastischem Darmepithel ($n = 4$ größere Darmabschnitte mit entfernten Tumorgewebe) innerhalb eines Genotyps verglichen (Tum-SePP^{+/+} / Cont-SePP^{+/+}; Tum-SePP^{+/-} / Cont-SePP^{+/-}). Die rechte Spalte beinhaltet die Expressionsänderung in APC^{Min/+}-Tieren, und die linke Reihe listet die Gene auf, welche in den APC^{Min/+}/SePP^{+/-}-Mäusen im Tumorgewebe verändert sind. Zur Normalisierung der Gene wurden 18S rRNA als interner Standard verwendet. Die statistischen Angaben wurden dem Programm REST Version 1.9.12 entnommen und basieren auf der Analyse nach Taylor. (***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$; +, $p < 0,1$).

Selenoproteine / Selenmetabolismus	Tum-SePP ^{+/+} / Cont- SePP ^{+/+}	Tum-SePP ^{+/-} / Cont- SePP ^{+/-}
Glutathione peroxidase 1 (GPx1)	3,2***	2,5***
Glutathione peroxidase 2 (GPx2)	1,3	1,8**
Glutathione peroxidase 4 (GPx4)	1,3	1,2
Selenoprotein 15 (Sep15)	0,2	0,5*
Selenoprotein P (SePP)	0,2***	0,2**
Selenoprotein S (SelS)	0,1*	0,6
Inflammation		
Interleukin 6 (Il6)	2,9	6,5***
Tumor necrosis factor α (TNF α)	0,1**	0,7
Metallothionein 1 (Mt1)	0,9	1,7 ⁺
Metallothionein 2 (Mt2)	4,6**	4,2 ⁺
Prostaglandin E synthase 2 (Ptges2)	1,2	1,3
Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (Ptgs2, Cox2)	28,9***	12,3***

Peroxisome proliferator activated receptor gamma (Pparg)	81,2**	5,0
Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)	1,5	1,2
Serum amyloid A 1 (Saa1)	0,1**	0,04**
Serum amyloid A 2 (Saa2)	1,0	60,1*
Serum amyloid A 3 (Saa3)	0,1***	0,1***
Mast cell protease 1 (Mcpt1)	0,1*	0,2
Mast cell protease 2 (Mcpt2)	0,06*	0,2
Carboxypeptidase A3, mast cell (Cpa3)	0,04**	0,1
Wachstumsfaktoren		
Insulin-like growth factor 1 (IGF1)	5,0*	2,3 ⁺
Insulin-like growth factor 2 (IGF2)	0,1*	2,1
Insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP1)	5,5***	1,5
Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2)	4,2**	1,6*
Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)	63,4***	30,4***
Ghrelin (Ghrl)	0,2***	0,4**
Fibroblast growth factor 17 (Fgf17)	3,1 ⁺	1,8
Connective tissue growth factor (Ctgf)	0,8	0,9
Growth differentiation factor 10 (Gdf10)	1,0	6,4 ⁺
WNT/beta-Catenin Stoffwechselweg		
Cyclin D1 (Cnd1)	2,7*	1,8*
Jun proto-oncogene related gene d1 (Jund1)	0,8	0,7
Myelocytomatosis oncogene (Myc)	4,2*	2,6 ⁺
Catenin (cadherin associated protein), beta 1 (Ctnnb1)	2,3 ⁺	2,2**
Adenomatosis polyposis coli (APC)	0,2*	0,7

Onkogene		
Transformation related protein 53 (Trp53)	0,1*	0,3*
Myeloblastosis oncogene (Myb)	1,4	1,0
Cyclin C (Ccnc)	3,7	2,8
Cyclin D binding myb-like transcription factor 1 (Dmtf1)	0,5	0,5*
Bcl2-like 1 (Bcl2l1)	3,1*	2,5**
Trans-acting transcription factor 4 (Sp4)	10,4**	6,8**
Extrazelluräre Matrix / Struktur-Gene		
Matrix metalloproteinase 9 (Mmp9)	5,6*	2,9**
Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (Timp2)	9,8***	3,2**
Claudin 1 (Cldn1)	0,03**	0,5
Claudin 3 (Cldn3)	0,5	3,1
Procollagen, type IV, alpha 5 (Col4a5)	3,5*	0,8
A disintegrin and metalloproteinase domain 21 (Adam21)	2,3	2,1**
Andere		
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	2,9*	2,5**
Solute carrier family 13 (sodium/sulphate symporters), Member 1 (Slc13a1, NaSi1)	0,05**	0,04***
Nucleoredoxin (Nxn)	8,0***	2,5**
GTPase-activating protein for SBP	1,0	0,9
Angiogenin (Ang1)	0,7	0,6*
Vesicle-associated membrane protein 3 (Vamp3)	0,4	10,5
Endothelin receptor type B (Ednrb)	0,1***	0,9
Cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector A (Cidea)	0,02***	0,04**
Solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 1 (Slc5a1)	2,2	3,3*

Bei Vergleichen von normalem Darmepithel mit Tumorgewebe in den Kontrolltieren (APC^{Min/+}) konnten die Ergebnisse von 5.2 untermauert werden. Wie der Northern Blot bereits zeigte, ergab auch die qRT-PCR-Analyse eine deutliche Reduktion an gebildetem SePP (mRNA-Erhöhung: 0,2***) wie auch eine vermehrte Bildung von GPx2-mRNA (Erhöhung: 1,3). Dieses Bild war auch auf die Situation in SePP-heterozygoten Mäusen übertragbar. Die Expression von SePP-mRNA (Erhöhung: 0,2**) war deutlich erniedrigt, hingegen die von Gpx2-mRNA (Erhöhung: 1,8***) erhöht. Die zweite im Darm exprimierte zytosolische Glutathionperoxidase (GPx1) wurde ebenfalls sowohl im Wildtyp als auch im SePP-heterozygoten APC^{min}-Tumor verstärkt exprimiert.

Der Sodium/sulphate symporter, member 1 (Slc13a1, NaSi1), welcher für den Transport von Selenat verantwortlich sein könnte, war unabhängig vom Genotyp im Tumor gegenüber normalem Darmepithel kaum exprimiert (mRNA-Erhöhung: wt: 0,05***, het: 0,04***).

Endokrine Wachstumsfaktoren spielen in der Krebsentwicklung eine wichtige Rolle. Es zeigte sich aber nur im Falle von IGF1 eine konsistente Erhöhung der Expression. Die mRNA-Expression des embryonalen Wachstumsfaktors IGF2 hingegen war im Wildtyp-Tumor signifikant erniedrigt (mRNA-Erhöhung: 0,1*). Im SePP-heterozygoten Tumor konnte keine statistisch signifikante Veränderung der Expression beobachtet werden.

Alle Transkripte der gemessenen Bindungsproteine von IGF1 waren im Tumorgewebe erhöht, im Falle des IGFBP3, welches das Hauptbindungsprotein des IGF1 im Serum ist, war dieser Anstieg besonders ausgeprägt (mRNA-Erhöhung: wt: 63***, het: 30***).

In beiden Genotypen waren Gene, welche mit Krebswachstum assoziiert werden, deutlich reguliert. Einige dieser Gene stellen integrale Bestandteile des APC/Wnt-Zellzyklus-Signalwegs dar (z.B. CcnD1), andere hingegen sind als APC-unabhängig beschrieben (z.B. CcnC, Myc). Diese deutliche Regulation von proliferationsrelevanten Genen spricht zum einen für die Präparation der Tumorproben, zum anderen für die starke Ähnlichkeit der APC^{min}-Tumore zwischen den beiden untersuchten Genotypen.

Ausgangspunkt der Genanalyse war der Vergleich zwischen SePP^{+/+}- und SePP^{+/-}-Tumoren. Hierbei sollten Unterschiede in der mRNA-Expression gefunden werden, welche das schnellere Wachstum bzw. den geringeren Differenzierungsgrad von SePP^{+/-}- gegenüber SePP^{+/+}- Tumoren erklären können. In Tabelle 5.3 sind die Daten der qRT-PCR zusammengefasst.

Tabelle 5.3: Expressionsunterschiede von APC^{Min/+}/SePP^{+/-}- gegen APC^{Min/+}-Tumore: Vergleich der mRNA-Expression von APC^{Min/+}/SePP^{+/-}- gegen APC^{Min/+}-Tumore (n = 8 Pools à 8 bis 10 Tumore, je Genotyp) mittels Real time-PCR. Als interner Standard wurden 18S rRNA verwendet. Die Auswertung der Real time-PCR erfolgte mit dem Programm REST Version 1.9.12. (***, p < 0,001; **, p < 0,01; *, p < 0,05; +, p < 0,1).

Selenoproteine / Selenmetabolismus	Tum-SePP ^{+/-} / Tum- SePP ^{+/+}
Glutathione peroxidase 1 (GPx1)	1,2
Glutathion peroxidase 2 (GPx2)	1,8***
Glutathion peroxidase 4 (GPx4)	1,0
Selenoprotein 15 (Sep15)	2,0
Selenoprotein P (SePP)	0,6*
Selenoprotein S (SelS)	0,5
Inflammation	
Interleukin 6 (Il6)	2,5*
Tumor necrosis factor (TNF)	0,6
Metallothionein 1 (Mt1)	1,8**
Metallothionein 2 (Mt2)	1,7
Prostaglandin E synthase 2 (Ptgs2)	1,2
Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (Ptgs2, Cox2)	1,1
Peroxisome proliferator activated receptor gamma (Pparg)	0,6
Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)	1,5
Serum amyloid A 1 (Saa1)	3,9 ⁺
Serum amyloid A 2 (Saa2)	1,7
Serum amyloid A 3 (Saa3)	2,0*
Mast cell protease 1 (Mcpt1)	0,9
Mast cell protease 2 (Mcpt2)	0,9
Carboxypeptidase A3, mast cell (Cpa3)	1,2

Wachstumsfaktoren	
Insulin-like growth factor 1 (IGF1)	2,1 ⁺
Insulin-like growth factor 2 (IGF2)	2,6
Insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP1)	1,3
Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2)	1,5
Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)	0,9
Ghrelin (Ghrl)	1,3 ⁺
Fibroblast growth factor 17 (Fgf17)	1,0
Connective tissue growth factor (Ctgf)	1,3
Growth differentiation factor 10 (Gdf10)	2,3
WNT/Beta-Catenin Stoffwechselweg	
Cyclin D1 (Ccn1)	1,2
Jun proto-oncogene related gene d1 (Jund1)	1,3
Myelocytomatosis oncogene (Myc)	1,0
Catenin (cadherin associated protein), beta 1 (Ctnnb1)	1,1
Adenomatosis polyposis coli (APC)	0,8
Onkogene	
Transformation related protein 53 (Trp53)	0,6
Myeloblastosis oncogene (Myb)	1,1
Cyclin C (Ccn1)	1,3*
Cyclin D binding myb-like transcription factor 1 (Dmtf1)	1,7
Bcl2-like 1 (Bcl2l1)	1,2
Trans-acting transcription factor 4 (Sp4)	0,8
Extrazelluläre Matrix / Struktur-Gene	
Matrix metalloproteinase 9 (Mmp9)	1,3
Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (Timp2)	1,5
Claudin 1 (Cldn1)	0,3

Claudin 3 (Cldn3)	1,0
Procollagen, type IV, alpha 5 (Col4a5)	0,9
A disintegrin and metalloproteinase domain 21 (Adam21)	1,1
Andere	
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	1,2
Solute carrier family 13 (sodium/sulphate symporters), Member 1 (Slc13a1, NaSi1)	1,1
Nucleoredoxin (Nxn)	1,0
GTPase-activating protein for SBP	1,3
Angiogenin (Ang1)	1,5*
Vesicle-associated membrane protein 3 (Vamp3)	0,6
Endothelin receptor type B (Ednrb)	0,8
Cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector A (Cidea)	1,3
Solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 1 (Slc5a1)	1,3

Trotz der morphologischen Unterschiede und der Tendenz, schneller und größer zu wachsen, differierten beide Tumor-„Arten“ in ihrem Expressionsmuster nur geringfügig. Diese unerwartete Erkenntnis zeichnete sich bereits bei der Analyse des Microarrays ab und setzte sich in der Analyse mittels qRT-PCR fort. Von den über fünfzig analysierten Genen zeigten nur wenige signifikante Veränderungen. Zusätzlich ist bei diesen Genen das Ausmaß der Veränderungen sehr gering. So ist das Zellzyklus-regulierende Gen *CcnC* nur um den Faktor 1,3* induziert. Auch das für die Vaskularisierung notwendige Gen *Ang1* zeigte eine Erhöhung von lediglich 1,5*.

Weitere Gene, welche statistisch gesehen erhöht exprimiert waren, hatten eine inflammatorische Komponente. So waren die Gene *Mt1*, *Il6*, *Saa3* und *Saa1* im *SePP^{+/-}*-Tumor annähernd doppelt so stark exprimiert. Andere mit Entzündung und Tumorstadium assoziierte Gene, wie das für die Synthese von PGE2-Prostaglandin notwendige *Ptges2* oder auch die für die Zyklisierung der Arachidonsäure wichtige *Cox2*, waren unbeeinflusst vom *SePP*-Gen-Status.

Von den Wachstumsfaktoren waren nur *IGF1* (mRNA-Erhöhung: 2,1⁺) und sein Bindungsprotein *IGFBP2* (Faktor 1,5⁺) leicht in ihrer Expression erhöht.

Gene wie β -Catenin (Ctnnb1) und Cyclin D1 (Ccnd1), welche in der APC/Wnt-Signalkaskade stehen, waren nicht verändert. Auch das nach dem Kinzler-Vogelstein-Tumormodell regulierte P53 (Trp53) bzw. Ras war auf Genexpressionsebene nicht betroffen.

Um herauszufinden, inwieweit die Unterschiede in der Expression durch die unterschiedlichen Tumorgößen beeinflusst sind, wurden die Ergebnisse aus den einzelnen Tumorpools zusätzlich nach Größe differenziert (siehe Tabelle 5.4). Hierbei war ersichtlich, dass große SePP^{+/-}- und SePP^{+/+}-Tumore sich deutlich stärker in ihrem Expressionsmuster und den Effekten voneinander unterschieden als dies in der Gruppe der kleinen bis mittleren Tumore der Fall war. So war GPx2 in kleinen Tumoren nur um 60 % verändert, in großen Tumoren hatte sich der Unterschied bereits verdoppelt.

Insgesamt war in kleinen Tumoren lediglich ein Gen signifikant unterschiedlich stark exprimiert, und zwar GPx2. Weitere Unterschiede entwickeln sich offenbar während des Tumorwachstums, so dass sich in der Gruppe der großen Tumore insgesamt 13 der untersuchten Gene signifikant zwischen beiden Tumorarten unterschieden. Hierbei sind vor allem Inflammationsvermittelnde Gene wie Ptges2, Mt1, Saa3, Il6 hervorzuheben. Doch zeigen sich auch Gene wie Mmp9, Ccnc, Ang1 sowie Wachstumsfaktoren der IGF-Reihe reguliert, welche mit vermehrter Tumorigenese assoziiert werden können.

Tabelle 5.4: Expressionunterschiede der Tumore in Abhängigkeit von der Tumorgöße: Die in Tabelle 5.3 erhobenen Daten der Real time-PCR wurden nach Tumorgöße differenziert. Ergebnisse der kleinen Tumore (< 2 mm; n = 4) sind in der mittleren Spalte zusammengefasst und die der großen Tumore (> 2 mm; n = 4) in der rechten Spalte. (***, p < 0,001; **, p < 0,01; *, p < 0,05; +, p < 0,1). Die Unterschiede im Expressionsmuster von APC^{Min/+}/SePP^{+/-}- gegen APC^{Min/+}-Tumore werden besonders beim Vergleich der großen Tumore (> 2 mm) deutlich.

	nur kleine Tumore (< 2 mm)	nur große Tumore (> 2 mm)
Selenoproteine / Selenmetabolismus	Tum-SePP ^{+/-} / Tum- SePP ^{+/+}	Tum-SePP ^{+/-} / Tum- SePP ^{+/+}
Glutathione peroxidase 1 (GPx1)	1,1	1,4*
Glutathion peroxidase 2 (GPx2)	1,6*	2,0*
Glutathion peroxidase 4 (GPx4)	0,9	1,0
Selenoprotein 15 (Sep15)	1,5	2,6
Selenoprotein P (SePP)	0,6	0,5*
Selenoprotein S (SeIS)	0,4	0,6

Inflammation		
Interleukin 6 (Il6)	2,0	3,1**
Tumor necrosis factor (TNF)	0,2	1,5
Metallothionein 1 (Mt1)	1,6	2,0*
Metallothionein 2 (Mt2)	1,6	1,7
Prostaglandin E synthase 2 (Ptges2)	1,1	1,3*
Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (Ptgs2, Cox2)	0,9	1,3
Peroxisome proliferator activated receptor gamma (Pparg)	0,9	0,4
Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)	1,1	2,1**
Serum amyloid A 1 (Saa1)	3,5	4,3
Serum amyloid A 2 (Saa2)	0,4	7,8
Serum amyloid A 3 (Saa3)	1,3	3,1*
Mast cell protease 1 (Mcpt1)	0,7	1,1
Mast cell protease 2 (Mcpt2)	0,6	1,3
Carboxypeptidase A3, mast cell (Cpa3)	0,7	2,1
Wachstumsfaktoren		
Insulin-like growth factor 1 (IGF1)	1,6	2,6
Insulin-like growth factor 2 (IGF2)	1,4	4,7 ⁺
Insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP1)	1,1	1,6*
Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2)	1,2	1,9*
Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)	0,8	0,8
Ghrelin (Ghrl)		1,4
Fibroblast growth factor 17 (Fgf17)	0,8	1,2
Connective tissue growth factor (Ctgf)	1,0	1,7
Growth differentiation factor 10 (Gdf10)	5,7	1,1

WNT/Beta-Catenin Stoffwechselweg		
Cyclin D1 (Ccnd1)	1,2	1,2
Jun proto-oncogene related gene d1 (Jund1)	1,1	1,4*
Myelocytomatosis oncogene (Myc)	1,1	1,2
Catenin (cadherin associated protein), beta 1 (Ctnnb1)	1,0	1,3
Adenomatosis polyposis coli (APC)	0,6	1,0
Onkogene		
Transformation related protein 53 (Trp53)	0,6	0,7
Myeloblastosis oncogene (Myb)	1,0	1,3
Cyclin C (Ccnc)	1,2	1,4 ⁺
Cyclin D binding myb-like transcription factor 1 (Dmtf1)	2,2	1,2
Bcl2-like 1 (Bcl2l1)	1,1	1,4 ⁺
Trans-acting transcription factor 4 (Sp4)	0,8	0,9
Extrazelluläre Matrix / Struktur-Gene		
Matrix metalloproteinase 9 (Mmp9)	0,8	2,2*
Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (Timp2)	1,1	2,1*
Claudin 1 (Cldn1)	0,1 ⁺	1,1
Claudin 3 (Cldn3)	0,5	1,9
Procollagen, type IV, alpha 5 (Col4a5)	0,7	1,2
A disintegrin and metalloproteinase domain 21 (Adam21)	0,9	1,4 ⁺
Andere		
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	1,1	1,4 ⁺
Solute carrier family 13 (sodium/sulphate symporters), Member 1 (Slc13a1, NaSi1)	0,9	1,4
Nucleoredoxin (Nxn)	0,9	1,2

GTPase-activating protein for SBP	1,1	1,5*
Angiogenin (Ang1)	1,4	1,6*
Vesicle-associated membrane protein 3 (Vamp3)	0,1	3,1
Endothelin receptor type B (Ednrb)	0,5 ⁺	1,3
Cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector A (Cidea)	0,9	1,7 ⁺
Solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 1 (Slc5a1)	1,5	1,1

Die Vergleichende Analyse der nicht-tumorösen Darmmucosa (siehe Tabelle 5.5) macht deutlich, dass die mRNA-Menge an IGF1, IGFBP1 und IGFBP2 im nicht-neoplastischen Gewebe erhöht sind. Zusätzlich werden auch Saa1 und Saa2 merklich vermehrt produziert.

Tabelle 5.5: Expressionsunterschiede von APC^{Min/+}/SePP^{+/-}- gegen APC^{Min/+}-Darmmucosa: Vergleich der mRNA-Expression von APC^{Min/+}/SePP^{+/-}- gegen APC^{Min/+}-Darmmucosa (n = 3 je Genotyp) mittels Real time-PCR. Als interner Standard wurden 18S rRNA verwendet. Die Auswertung der Real time-PCR erfolgte mit dem Programm REST Version 1.9.12. (***, p < 0,001; **, p < 0,01; *, p < 0,05; ⁺, p < 0,1).

Selenoproteine / Selenmetabolismus	Mucosa-SePP ^{+/-} / Mucosa-SePP ^{+/+}
Glutathione peroxidase 1 (GPx1)	1,6
Glutathion peroxidase 2 (GPx2)	1,3
Glutathion peroxidase 4 (GPx4)	1,1
Selenoprotein 15 (Sep15)	4,1
Selenoprotein P (SePP)	0,5*
Selenoprotein S (SelS)	2,8
Inflammation	
Interleukin 6 (Il6)	1,1
Tumor necrosis factor (TNF)	4,1
Metallothionein 1 (Mt1)	1,0
Metallothionein 2 (Mt2)	1,8

Prostaglandin E synthase 2 (Ptges2)	1,2
Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (Ptgs2, Cox2)	2,6
Peroxisome proliferator activated receptor gamma (Pparg)	9,6
Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)	1,8
Serum amyloid A 1 (Saa1)	8,9*
Serum amyloid A 2 (Saa2)	106,4*
Serum amyloid A 3 (Saa3)	3,7
Mast cell protease 1 (Mcpt1)	1,5
Mast cell protease 2 (Mcpt2)	2,7
Carboxypeptidase A3, mast cell (Cpa3)	4,3
Wachstumsfaktoren	
Insulin-like growth factor 1 (IGF1)	4,4*
Insulin-like growth factor 2 (IGF2)	0,1 ⁺
Insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP1)	4,8**
Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2)	4,1**
Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)	1,8
Ghrelin (Ghrl)	0,6
Fibroblast growth factor 17 (Fgf17)	1,7
Connective tissue growth factor (Ctgf)	1,1
Growth differentiation factor 10 (Gdf10)	15,6 ⁺
WNT/Beta-Catenin Stoffwechselweg	
Cyclin D1 (Ccnd1)	1,8
Jun proto-oncogene related gene d1 (Jund1)	1,3
Myelocytomatosis oncogene (Myc)	1,7
Catenin (cadherin associated protein), beta 1 (Ctnnb1)	1,1
Adenomatosis polyposis coli (APC)	2,1

Onkogene	
Transformation related protein 53 (Trp53)	2,2
Myeloblastosis oncogene (Myb)	1,6
Cyclin C (CcnC)	1,7
Cyclin D binding myb-like transcription factor 1 (Dmtf1)	1,6
Bcl2-like 1 (Bcl2l1)	1,5
Trans-acting transcription factor 4 (Sp4)	1,3
Extrazelluläre Matrix / Struktur-Gene	
Matrix metalloproteinase 9 (Mmp9)	2,6
Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (Timp2)	4,6**
Claudin 1 (Cldn1)	4,3
Claudin 3 (Cldn3)	5,5
Procollagen, type IV, alpha 5 (Col4a5)	3,9*
A disintegrin and metalloproteinase domain 21 (Adam21)	1,2
Andere	
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	1,3
Solute carrier family 13 (sodium/sulphate symporters), Member 1 (Slc13a1, NaSi1)	1,4
Nucleoredoxin (Nxn)	3,4*
GTPase-activating protein for SBP	1,3
Angiogenin (Ang1)	1,7
Vesicle-associated membrane protein 3 (Vamp3)	16,8 ⁺
Endothelin receptor type B (Ednrb)	5,8*
Cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector A (Cidea)	2,5
Solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 1 (Slc5a1)	2,0

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die APC^{min}-Tumore trotz eines SePP-Allel-Mangels, sich in der Genexpression nur geringfügig von SePP^{+/+}-Tumoren unterschieden, während sich in der histopathologischen Tumordiagnostik deutliche Unterschiede zeigten.

Der APC/Wnt-Signalweg und die darauf aufbauenden klassischen Onkogene des Kinzler-Vogelstein-Tumormodells waren in ihrer Genexpression weitgehend unbeeinflusst. Vielmehr zeigten sich inflammatorische Gene sowie Wachstumsfaktoren und Zellzyklus-Regulatoren erhöht.

5.5. Immunhistologie der Tumore in Abhängigkeit von SePP

Die Auswertung der Genchips ergab eine erhöhte Expression von Mastzell-spezifischen Genen im SePP^{+/-}-Tumorgewebe. Mastzellen sind Teil der körpereigenen Abwehr, welche im Darm eine wichtige Rolle in der Immunantwort spielen. Eine Aktivierung kann eine Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Histamin, Heparin, Eicosanoide und TNF α zur Folge haben, welche das Wachstum und die Angiogenese fördern könnten (Lazar, et al., 2006; ; Leslie, 2007).

Ein erhöhtes Einwandern von Mastzellen wurde anhand von immunhistologischen Färbungen von Tumorschnitten untersucht. Die hierfür notwendigen Schnitte waren Serienschnitte der histologischen Untersuchung (5.3.3) und wurden von Dr. S. Florian in der Arbeitsgruppe Brigelius-Flohé, Deutsches Institut für Ernährungsforschung (DIFE), Potsdam-Rehbrücke, gefärbt.

Die angefärbten Mastzellen wurden ausgezählt, wobei sich zeigte, dass in APC^{Min/+}/SePP^{+/-}-Tumoren ca. fünfmal mehr Mastzellen eingewandert waren als in Tumore von APC^{Min/+}-Mäusen. Dieses beschränkte sich nicht nur auf das Tumorgewebe, vielmehr waren im umliegenden Darmmuskel dreimal mehr Mastzellen zu finden (siehe Abb. 5.17).

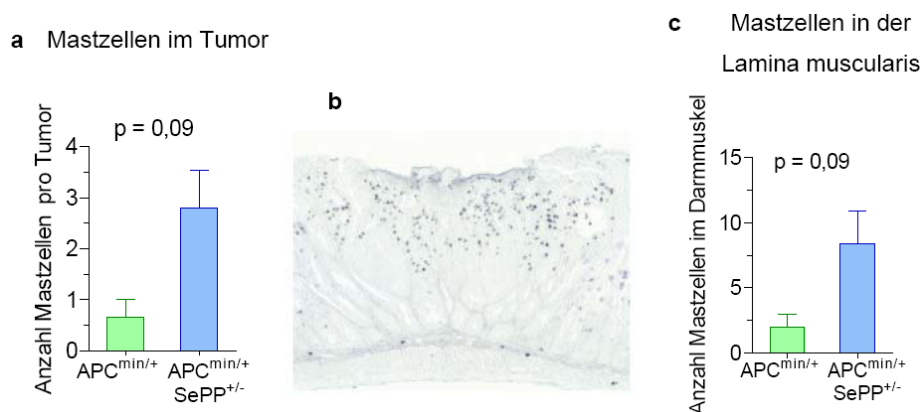


Abbildung 5.17: Immunhistologische Färbung von Mastzellen: Exemplarisch dargestellt ist eine Mastzell-spezifische Färbung eines Tumors (b). Es wurde die Anzahl der Mastzellen im Tumorgewebe (a) und in dem umliegenden Darmmuskel (c) gezählt. APC^{min}-Mäuse, heterozygot für SePP, zeigen tendenziell mehr Mastzellen im Tumor und im umliegenden Darmmuskel gegenüber Tieren mit zwei funktionstüchtigen SePP-Allelen.

5.6. Expression selenabhängiger Enzyme im Darm - Einfluss durch SePP

SePP ist ein Transport- und Speicherprotein. Wie bereits in der Beschreibung des Phänotyps der SePP-Maus deutlich gemacht wurde (siehe Einleitung), hat die SePP^{-/-}-Maus eine gestörte Selenverteilung. Blut und Organe, wie Hirn, Niere und Hoden, verarmen an Selen, hingegen reichert sich das nicht mehr abtransportierte Selen in der Leber an.

Es stellte sich die Frage, ob auch der Darm, welcher das Selen aus der Nahrung aufnimmt, von diesem gestörten Selentransport betroffen ist. Zur Aufklärung dieser Fragestellung wurden 60 Tage alte Tiere verschiedenen Genotyps herangezogen, da vorangegangene Untersuchungen bereits in diesem Alter eine einsetzende Tumorentwicklung zeigten (siehe Abbildung 5.12). Um tumorinduzierte Inflammation als Ursache für eine Veränderung des Selenstatus auszuschließen, wurden für die Analyse keine APCmin-Tiere verwendet. Das geringe Alter der Tiere erlaubte es, auch SePP^{-/-}-Tiere in den Versuch mit einzuschließen.

Der longitudinal geöffnete native Dünndarm wurde wiederum in drei gleich lange Abschnitte unterteilt (von proximal zu distal betitelt als DüDa I, DüDa II und DüDa III).

Aus den einzelnen Darmabschnitten wurden Proteinhomogenate erstellt. Die Homogenisation erfolgte in einem nicht-denaturierenden Puffer, so dass neben dem Selengehalt auch die GPx- und die TxnRd-Aktivitäten ermittelt werden konnten. Alle Messergebnisse wurden auf die Proteinkonzentration bezogen.

5.6.1. Selenkonzentration im Darmgewebe des Intestinaltrakts

Die Bestimmung von Selen kann durch eine Vielzahl von Methoden erfolgen, wobei die Atomabsorptionsspektroskopie die gebräuchlichste Methode ist. Die in dieser Arbeit verwendete fluorimetrische Selenbestimmung stellte eine Methode mit deutlich geringerem apparativen Aufwand dar und rechtfertigte für den Nicht-Routine-Betrieb den höheren präparativen Anspruch. Auch die Selektivitäten und Nachweisgrenzen (ppb-Bereich) sind mit dem „Goldstandard“ der AAS durchaus vergleichbar.

In den gemessenen Darmproben zeigte sich ein deutlicher Dosiseffekt des SePP-Genmangels (siehe Abb. 5.18). Gegenüber der Wildtyp-Maus waren im Intestinaltrakt der SePP^{+/-}-Maus nur noch 77 % an totaler Selenkonzentration nachweisbar. Bei Verlust beider SePP-Allele baute sich dieser Selenmangel auf 50% aus, verglichen mit Kontrolltieren.

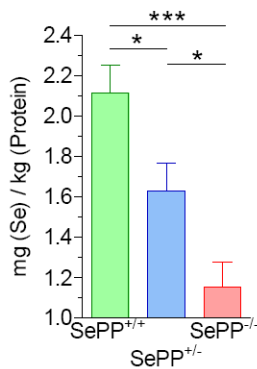


Abbildung 5.18: Selengehalt im gesamten Intestinaltrakt: Die Selenanalytik erfolgte mit der Methode der fluorimetrischen Vermessung als Piazselenol. Der Intestinaltrakt (Dünn- und Dickdarm) von 60 Tage alten SePP^{+/+}-, SePP^{+/-}- und SePP^{-/-}-Mäusen (n = 12 je Gruppe) zeigt eine deutliche Abhängigkeit von Selen und SePP (One-way ANOVA; Bonferroni's multiplen Vergleichstest; *, p < 0,05; ***, p < 0,001.)

Betrachtet man die einzelnen Darmabschnitte differenzierter, so fällt eine Abnahme der Selenkonzentration von proximal zu distal auf (siehe Abb. 5.19). Dieser Trend konsistierte in allen Genotypen, jedoch auf unterschiedlichem Niveau.

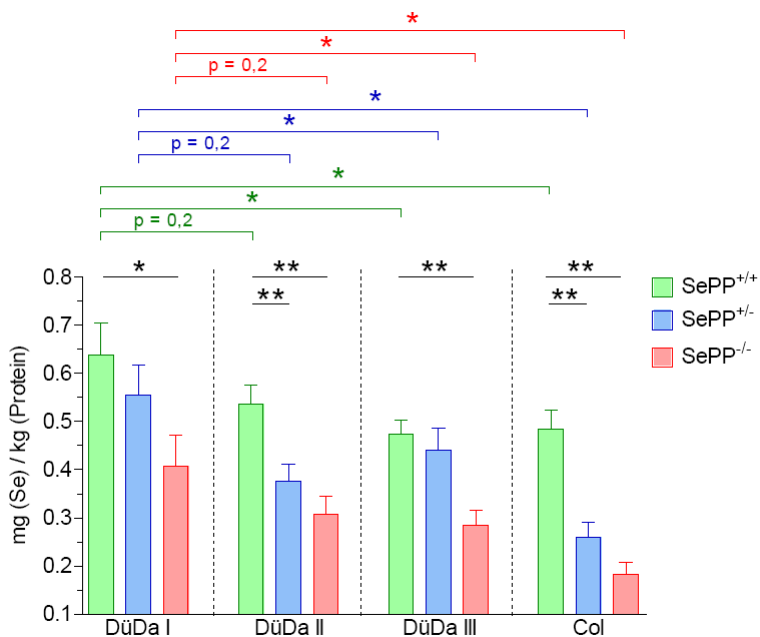


Abbildung 5.19: Selengehalt der einzelnen Darmabschnitte: Mittels der Methode der Fluorimetrie wurde der Selengehalt im proximalen- (DüDa I), medianen- (DüDa I) und distalen- (DüDa I) Dünndarm wie auch im Colon (Col) vermessen. Bei den Tieren handelte es sich um 60 Tage alte SePP^{+/+}-, SePP^{+/-}- und SePP^{-/-}-Mäusen (n = 12 je Gruppe). Unabhängig vom SePP-Genotyp zeigte sich eine tendenzielle Abnahme des Selengehaltes im Darmgewebe von proximal zu distal. Dieser Effekt war bei SePP^{-/-}-Mäusen besonders stark ausgeprägt. Innerhalb der einzelnen Darmabschnitte ist durch Verlust des Selentransportproteins SePP eine Abnahme in den SePP^{-/-}- bzw. SePP^{+/-}-Mäusen gegen über den Kontrolltieren (SePP^{+/+}) zu verzeichnen. (*, p < 0,05; **, p < 0,01; zweiseitig, ungepaarter t-Test)

5.6.2. GPx-Aktivität im Darmgewebe

Im Intestinaltrakt kommen zwei Formen der GPx vor: sowohl die ubiquitär exprimierte GPx1 als auch die Verdauungstrakt-spezifische GPx2. Beide Peroxidasen sind zytosolische Enzyme mit ähnlichen Aktivitäten und Substratspektren. Mittels des in dieser Arbeit genutzten GPx-Enzymtests war es nicht möglich, zwischen beiden Isoenzymen zu diskriminieren. Die dritte, auch im Darm vorkommende GPx, die membranständige GPx4, wurde von dieser Messmethode nicht erfasst.

Integrierte man die GPx-Aktivitäten über den gesamten gemessenen Darmabschnitt, wurde deutlich, dass bereits der Verlust nur eines aktiven SePP-Allels einen deutlichen Verlust an GPx-Aktivität zur Folge hat (66 % „Restaktivität“). Erstaunlicherweise setzte sich diese Dosisabhängigkeit in SePP^{-/-}-Mäusen nicht fort. SePP-KO-Tiere wiesen nur unwesentlich geringere „Restaktivitäten“ (63 %) als SePP-heterozygote Mäuse auf (Abb. 5.20).

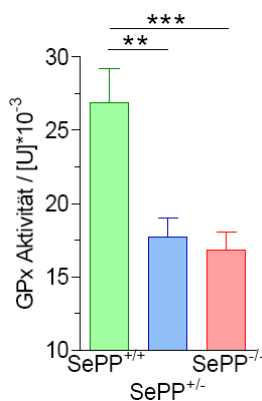


Abbildung 5.20: GPx-Aktivität im Darm: Mittels Enzymtest wurde die GPx-Aktivität im Verdauungstrakt von 60 Tage alten SePP^{+/+}- (n = 12), SePP^{+/-}- (n = 13) und SePP^{-/-}-Mäusen (n = 11) gemessen. Die Analyse verdeutlicht, dass bereits der Verlust eines SePP-Allels einen ähnlich drastischen Verlust an GPx-Aktivität nach sich zieht, ähnlich wie im Falle des kompletten Verlustes an SePP. (One-way ANOVA; Bonferroni's multipler Vergleichstest; **, p < 0,01; ***, p < 0,001.)

Betrachtet man die GPx-Aktivitäten in den verschiedenen Segmenten des Darms, so ist auch hier deutlich, dass das proximale Darmsegment, unabhängig vom Genotyp, die höchste Aktivität aufweist (siehe Abb. 5.21).

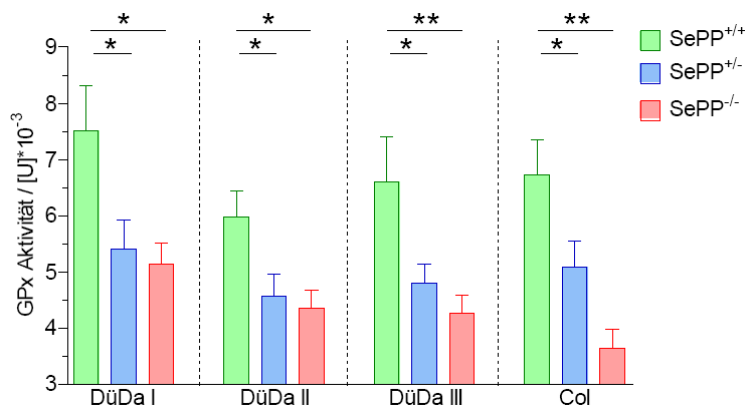


Abbildung 5.21: Glutathionperoxidase-Aktivität in Darmabschnitten: Mittels NADPH-verbrauchendem Enzymtest wurde die Aktivität der zytosolischen Glutathionperoxidasen (GPx) in einzelnen Abschnitten des murinen proximalen (DüDa I), medianen (DüDa II), distalen Dünndarm (DüDa III) sowie Colon (Col)) bestimmt. Für die Messung wurden 60 Tage alte SePP^{+/+}-, SePP^{+/-}- und SePP^{-/-}-Mäusen (n = 12 je Gruppe) eingesetzt. In Abhängigkeit von SePP zeigte sich ein Gendosiseffekt, wobei in dem Verdauungstrakt von Kontrolltieren (SePP^{+/+}) deutlich mehr Aktivität des Peroxid-abbauenden GPx war, als in den SePP-heterozygoten bzw. KO-Tieren. (*, p < 0,05; **, p < 0,01; zweiseitig, ungepaarter t-Test)

5.6.3. TxnRd-Aktivität im Darmgewebe

Im Vergleich zur GPx-Messung zeigte die Bestimmung der TxnRd ein deutlich anderes Bild: gegenüber den Wildtyp-Tieren war die Aktivität der TxnRd in SePP^{+/-}-Mäusen nicht verändert. Auch in den SePP^{-/-}-Tieren war die Aktivität nur um 12 % erniedrigt (siehe Abb. 5.22).

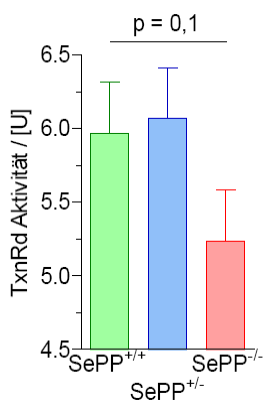


Abbildung 5.22: TxnRd-Aktivität im Darm: die Analyse des Intestinaltrakts 60 Tage alter SePP^{+/+}-, SePP^{+/-}- und SePP^{-/-}-Mäuse (n = 12 je Gruppe) zeigte nur im Falle eines totalen SePP-Verlustes eine tendenziell erniedrigte Aktivität von TxnRd. (One-way ANOVA; Bonferroni's multiplen Vergleichstest.)

Auch die TxnRd-Aktivität fiel im Verlauf des Intestinaltrakts von proximal zu distal ab.

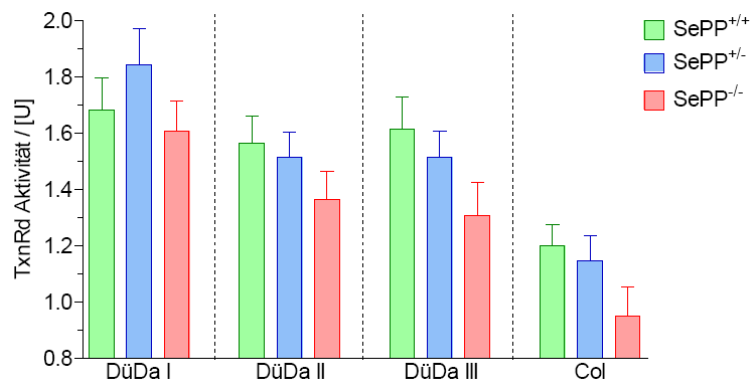


Abbildung 5.23: Thioredoxinreduktase-Aktivität in Darmabschnitten: Durch Reduktion von Ellman's Reagenz konnte die Aktivität der Thioredoxinreduktase (TxnRd) in Darmabschnitten proximaler (DüDa I), medianer (DüDa II), distaler Dünndarm (DüDa III), Colon (Col)) von 60 Tage alten SePP^{+/+}, SePP^{+/-} und SePP^{-/-}-Mäusen (n = 12 je Gruppe) gemessen werden. Tendenziell zeigte sich nur in den Tieren mit komplettem SePP-Verlust (SePP^{-/-}) eine Verringerung der Aktivität der Thioredoxinreduktase.

6. Diskussion

Die Bewertung von Selen als toxische bzw. karzinogene Substanz hat sich in den letzten Jahren grundlegend gewandelt (Vernie, 1984). Selen gilt heute als essentielles Spurenelement für den höheren Säugerorganismus. Eine ungenügende Selenversorgung wird mit einer Reihe von Erkrankungen und im Besonderen mit der Prädisposition für bestimmte Pathologien sowie einer schlechteren Prognose und länger dauernden Konvaleszenz in Verbindung gebracht (Rayman and Rayman, 2002). Hierbei sind die molekularen Ursachen und Wirkungen zum Teil meist noch ungeklärt, aber oft korrelieren die Erkrankungswahrscheinlichkeit und die Schwere der Symptome negativ mit dem Selenstatus der betrachteten Kollektive in epidemiologischen Analysen. Dies gilt auch und im Besonderen für Krebserkrankungen (Rayman, 2005). Es existieren mehr als hundert epidemiologische und tierexperimentelle Studien, welche sich mit dem Einfluss von Selen auf Krebserkrankungen bzw. das Erkrankungsrisiko beschäftigen. In über 60% der Studien wurde eine inverse Korrelation zwischen Selenversorgung und Krebs beobachtet (Combs and Gray, 1998; Rayman, 2005). Neben Lungen- und Prostatakrebs zeigten sich vor allem Tumorerkrankungen des Intestinaltrakts als selenresponsiv (Combs, 2001). Diese Arbeit hatte zum Ziel, einen Beitrag zum besseren molekularen Verständnis des Einflusses von Selen und der Selenoproteine auf das Tumorstadium im Darm zu leisten.

6.1. Studien an Colonkarzinom-Zelllinien

Am Anfang dieser Arbeit wurden Beobachtungen aus der Literatur aufgegriffen, welche zeigten, dass Colontumore im Vergleich zu gesunder Mukosa wenig oder kein SePP transkribieren (Al-Taie, et al., 2004). Dies spiegelte sich auch in den drei untersuchten *in vitro*-Modellen wider, welche ursprünglich aus humanen Colonkarzinomen kultiviert wurden. Es handelte sich hierbei um gut charakterisierte und in der Literatur ausgiebig beschriebene Zelllinien (Morin, et al., 1996; Ramsay, et al., 2005; Santoro and Groden, 1997; Whitehead, et al., 1985). Trotz des Vorhandenseins von genomischer SePP-DNA, welche mit SePP-spezifischen Primern nachgewiesen wurde (Abbildung 5.2), konnte in den Zelllinien weder auf Protein- noch auf RNA-Ebene eine SePP-Expression festgestellt werden. Die fehlende Expression von SePP konnte auch nicht durch eine geeignete Selen-Supplementation in Form von Selenit positiv beeinflusst werden.

Ob der Verlust an SePP ein Resultat des Tumorstadiums ist, oder ob die gestörte Synthese von SePP einen kausalen Beitrag zur Karzinogenese darstellt, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Die Expressionsdaten aus der Literatur, wie auch die hier generierten Daten aus dem Microarray, Northern Blot und den qRT-PCR-Studien, zeigten jedoch einen deutlichen Zusammenhang zwischen Tumorstadium und verminderter SePP-Expression.

Im Folgenden sollen mögliche Ursachen diskutiert werden, welche diesem Phänomen zugrunde liegen könnten: Hierbei können Veränderungen in regulatorischen Elementen/Bereichen des SePP-Gens einen möglichen Erklärungsansatz darstellen. So wurden Polymorphismen in der Region des SePP-Promotors beschrieben (Al-Taie, et al., 2002), welche sich im Luciferase-Reporter-Assay als funktionell erwiesen. Diese genetischen Unterschiede können zwar eine verstärkte SePP-Transkription verschiedener Individuen bedingen, sind aber nicht geeignet, um

den SePP-Expressionsverlust im Tumor zu erklären, ist doch die SePP-Verminderung im Tumor in SePP-heterozygoten-Mäusen ähnlich stark wie in Wildtyp-Kontrolltieren

Alternativ könnte als molekulare Ursache auf genomischer Ebene das SePP-Gen auch in einem Bereich lokalisiert sein, der zum Verlust von genetischen Elementen während der Proliferation neigt. Ein prominentes Beispiel ist hier sicher das Gen DCC (deleted in colorectal carcinoma) (Park, et al., 2008). Gegen diese Option spricht, dass in den Ziellinien die genomische SePP-DNA per PCR nachweisbar war und auch in den *in vivo*-Tumorproben immer noch SePP-spezifische cDNA detektiert wurde. Interessanterweise war die SePP-Konzentration in den heterozygoten APCmin-Tumoren zu ca. 50% reduziert, im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltumoren also lediglich im Rahmen der Erwartung für einen SePP-Gendosiseffekt. Dieser Befund argumentiert auch gegen die andere denkbare Option zur tumorabhängigen Reduktion der SePP-mRNA-Expression, nämlich der chronischen Inhibition durch erhöhte lokale Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen (Dreher, et al., 1997; ; Mostert, et al., 1999; ; Mostert, et al., 2001). Auch hier wäre in den heterozygoten SePP-Mäusen eine Verstärkung des Effektes aufgrund des reduzierten Selenspiegels zu erwarten, welcher zu einer erhöhten Inhibition der SePP-mRNA-Expression geführt haben müsste. Da dies nicht beobachtet wurde, ist ein genereller Effekt im Tumor denkbar, der mit der Größe des Adenoms korreliert. Hier ergäbe sich als weitere Option eine Abhängigkeit der SePP-Transkription von der Sauerstoffversorgung, die im Tumor am geringsten ist. Entsprechend ist vielfach die Bedeutung solch einer krebs-spezifischen Hypoxie auf das Genexpressionsprofil über den sauerstoffsensitiven Transkriptionsfaktor HIF1 α beschrieben (Cramer, et al., 2003). Inwieweit aber Änderungen der Methylierung des SePP-Gens oder HIF-abhängige Expressionen bzw., hiervon unabhängige Inaktivierungsmechanismen bei SePP zum Tragen kommen, konnte in dieser Arbeit nicht weiter untersucht werden, bietet sich aber für Folgestudien *in vitro* und mit dem Tumormaterial aus den transgenen Mäusen an.

Das Auftreten zusätzlicher spezifischer Mutationen, die z.B. einen Aminosäureaustausch oder einen prämaternen Translations-Stopp verursachen, kann in Einzelfällen die Tumorigenese und den SePP-Verlust weiter beschleunigen. Im Falle der Selenoproteine wäre auch eine Veränderung des SECIS-Elementes, welches sich im untranslatierten Bereich der mRNA befindet, denkbar. Eine schlechtere Bindung des SBP2 wäre die Folge, wodurch das SeCys ebenso wie bei einer prämaternen Stoppmutation nicht eingebaut werden kann. Es käme durch den Translations-Kontrollmechanismus des Nonsense-mediated decay (NMD) zur Detektion und Interpretation eines ungewünschten Stopp-Triplets inmitten des Leserasters, wodurch der Abbau des Transkriptes eingeleitet würde (Squires, et al., 2007; ; Sun and Maquat, 2002). Resultierend wäre eine geringere Menge an Transkript in der Northern Blot- oder qRT-PCR-Analyse. Für GPx1 wurde ein solcher Abbau unter Selendefizienz bereits gezeigt und für die Tumorsituation als Erklärung angedacht (Moriarty, et al., 1998; ; Weiss Sachdev and Sunde, 2001).

Im menschlichen Genom liegen APC (5q21) und SePP (5q31) in enger Nachbarschaft auf dem Chromosom 5. SePP wurde unzutreffenderweise von Hill und Burk im Menschen auf 5q31 kartiert, es liegt aber eigentlich bei 5p11. Al-Taie äußert daher die Vermutung, dass mit dem partiellen chromosomalen Verlust des Tumorsuppressors APC auch das SePP-Gen verloren geht (Al-Taie, et al., 2004), so dass es zwischen einsetzender Tumorigenese und Verlust an SePP-Expression einen kausalen Zusammenhang gibt.

Wie bereits aufgeführt war ein ähnlicher Trend im Mausmodell zu verzeichnen. Mittels Northern Blot, qRT-PCR und Microarray (Paoni, et al., 2003) zeigte sich in der Darmmukosa eine deutlich verringerte SePP-Expression gegenüber dem Tumorgewebe. Allerdings ist anzumerken, dass in diesem Modellorganismus beide Gene nicht

kolokalisiert sind (APC Chromosom 18, 15,0 cM (Luongo, et al., 1993); SePP Chromosom 15, 5,9 cM). Gegen einen chromosomalen Verlust spricht auch die Tatsache, dass in den hier untersuchten humanen Colonkarzinom-Zelllinien wie auch in den Tumoren der Maus SePP auf genomischer Ebene nachzuweisen war.

Der Vergleich mit dem Mausmodell weist auf einen weiteren interessanten Effekt hin. So ist das Verhältnis Tumor- / Mukosagewebe in APC^{Min/+}- und APC^{Min/+}/SePP^{+/-}-Tieren gleich (0,21; p<0,01 und 0,24; p<0,01; siehe Tabelle 5.2). Sollte SePP durch eine Deletion funktionell inaktiviert worden sein, wäre die Wahrscheinlichkeit, dass dies in den APC^{Min/+}-Mäusen geschieht, ungleich geringer gegenüber APC^{Min/+}/SePP^{+/-}-Tieren, in denen bereits ein SePP-Allel genetisch inaktiviert wurde. Es ist daher davon auszugehen, dass die verringerte Expression von SePP nicht Folge von Mutationen oder Loss of Heterozygosity (LOH) ist. Dieser Vermutung liegt die begründete Annahme zugrunde, dass ein Adenom im Darm monoclonal ist und somit einer einzigen entarteten Zelle entspringt (Pinto and Clevers, 2005; ; Reya and Clevers, 2005; ; Siu, et al., 1999; ; Tatematsu, et al., 2003). Nach dem Tumormodell von Vogelstein und Kinzler betrifft dies vor allem undifferenzierte Zellen der proliferativen Zone in den Darm-Krypten (Kinzler and Vogelstein, 1998; ; Morin, et al., 1996; ; Nowak, et al., 2002; ; Rajagopalan, et al., 2003; ; Reya and Clevers, 2005). Somit ist es unwahrscheinlich, dass die geringere SePP-Expression im Tumor durch Mutationen verursacht ist. Vielmehr sollte von regulatorischen Ereignissen als Ursache für die verminderte Expression des unzweifelhaft vorhandenen SePP-Gens bei der Planung von Folgeexperimenten ausgegangen werden.

Da die Expression in den Zelllinien durch eine Selenit-Supplementation nicht beeinflussbar war und auch keine Expressionsveränderungen von SePP in den drei Colonkarzinom-Zelllinien bekannt sind, ist zu vermuten, dass es sich hier um ein epigenetisches Phänomen handeln könnte. In der Tat konnte durch *in silico* Analyse oberhalb des Transkriptionsstarts des humanen SePP-Genes ein CpG-Dinukleotid-Cluster identifiziert werden (siehe Abbildung 6.1). Dieser Cluster entspricht den von Gardiner-Garden und Frommer aufgestellten Suchkriterien (Gardiner-Garden and Frommer, 1987; ; Takai and Jones, 2002). Die Region erstreckt sich ca. 1700 bp oberhalb des Start-Kodons und ist ca. 300 bp lang. Eine Hypermethylierung solcher CpG-reichen Regionen, welche vorwiegend im Promotorbereich von Genen gefunden werden, kann eine Verminderung der Transkription zur Folge haben (Jones and Baylin, 2002). Generell wird angenommen, dass Tumore eher hypomethyliert sind (Cadieux, et al., 2006; ; Gaudet, et al., 2003). Doch können auch einzelne Gene durch Hypermethylierung verringert exprimiert werden (Feinberg, 2007; ; Jones and Baylin, 2007). Im Falle von Tumorsuppressorgen kann eine solche Inaktivierung das Krebswachstums entscheidend initiieren bzw. fördern.

Im Falle des SePP-Gens könnte eine tumorabhängige Veränderung im Methylierungsmuster vorliegen, welche zu einer verminderten SePP-Expression führt.

Hier sind sicher weitergehende Versuche sinnvoll, in denen durch pharmakologische Ansätze die Aktivität der Methyl-Transferasen beeinflusst wird, oder durch die Verwendung nicht-methylierbarer dC-Analoga (z.B. über das synthetische Nukleotid 5-aza-2'-deoxy-Cytidin) die Methylierung genomweit reduziert wird (Park, et al., 2008).

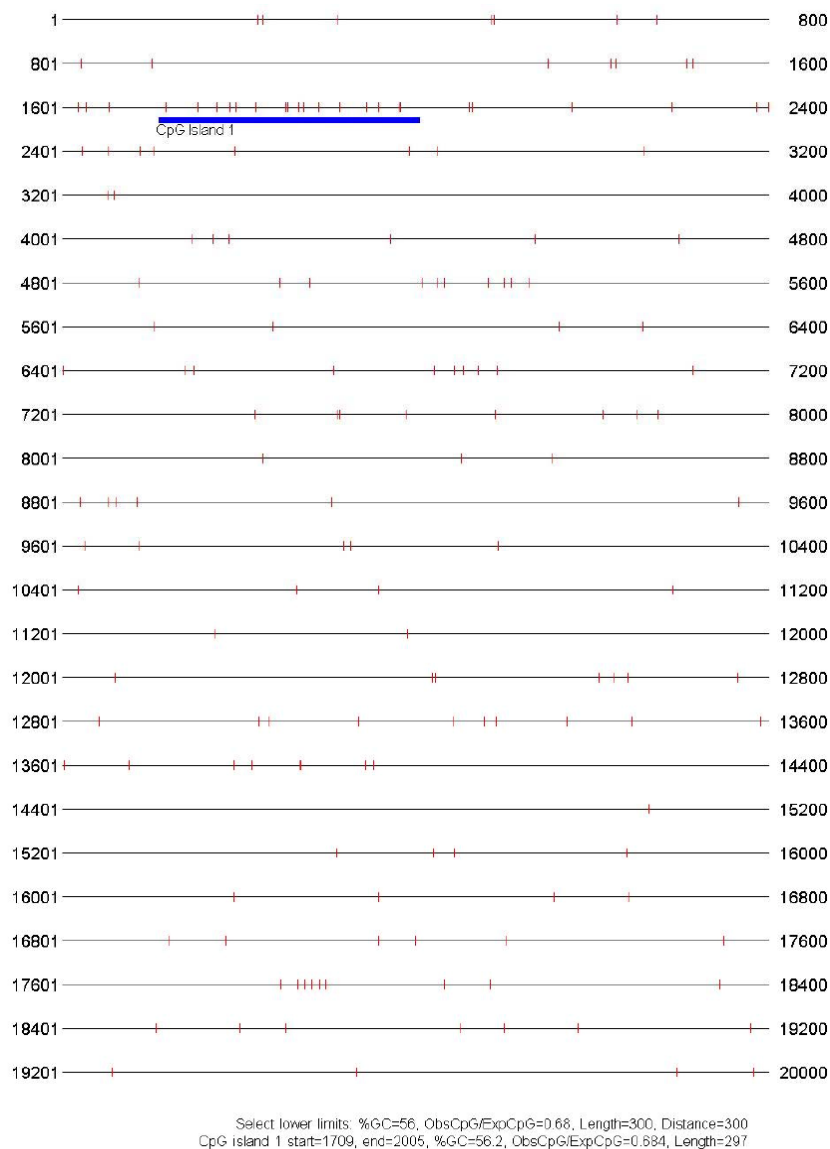


Abbildung 6.1: Putative Methylierungsstellen im Promotorbereich des humanen SePP-Gens: Die Analyse wurde mit dem Programm CpG Island Searcher, Version:10/29/04 (<http://www.cpgislands.com>) durchgeführt. Die Suche wurde auf einen Bereich von 20 kbp oberhalb des Gens ausgedehnt. Es konnte ein Bereich bei ca. 1700-2000 bp oberhalb des Transkriptionsstarts als CpG-Island identifiziert werden. Eine Methylierung des SePP-Promotors könnte zu einer verminderten Expression des SePP-Gens führen.

Die vorwiegend gastrointestinal exprimierte GPx2 ist das zweite Selenoprotein, welches mit intestinalen Tumoren immer wieder in Verbindung gebracht wird (Brigelius-Flohe, 2006; ; Chu, et al., 2004). Aber im Gegensatz zu SePP lässt sich die GPx2-mRNA im Tumor generell eher deutlich verstärkt nachweisen (Brigelius-Flohe, 2006; ; Mork, et al., 2000). Dieser Befund konnte auch in den hier vorgestellten Versuchen mit Colonkarzinom-Zelllinien bestätigt werden. In allen drei Zelllinien war GPx2-mRNA nachzuweisen, wobei in HT29 deutlich mehr Transkript vorhanden war als in HCT116 bzw. LIM1215.

Aus der Literatur ist zu entnehmen, dass es sich im Falle von HT29 um eine stark de-differenzierte Colonkarzinom-Zelllinie handelt (Sutherland, et al., 1986). Hingegen sind HTC116 und LIM1215 mäßig differenziert und stellen somit weniger stark entartete Tumorzellen dar (Chakrabarty, 1992; ; Kelly and Jones, 2003; ; Zamurs, et al., 2003). Hieraus eine Korrelation des Differenzierungsgrad mit der Expression einzelner Gene abzuleiten, fällt schwer, da aufgrund ihres unterschiedlichen Ursprungs kein direkter Vergleich der drei Zelllinien möglich ist. Auch ist unklar, inwieweit die Zelllinien nach jahrelangem Passagieren noch dem Expressionsmuster des primären Tumors entsprechen.

Die Arbeitsgruppe um Frau Prof. Brigelius-Flohé geht hier von einer transienten Expression aus, bei der die Menge an GPx2 zwar im Tumor erhöht ist, aber mit der Progression des Tumors abnehmen kann (Brigelius-Flohe, 2006). Die GPx2 ist Mitglied der Enzymklasse der GPx-Familie, welche den Abbau von Hydroperoxiden zu den entsprechenden Alkoholen katalysiert. Neben der ebenfalls zytosolisch aktiven GPx1, welche ubiquitär im Verdauungstrakt vorkommt, ist die GPx2 hauptsächlich in den Tiefen der Krypten exprimiert (Florian, et al., 2001). Das Vorhandensein eines Antioxidant-Responsiv-Elements (ARE) im GPx2-Promotor ermöglicht dem Transkriptionsfaktor Nrf2, die Expression von GPx2 zu regulieren (Banning, et al., 2005). GPx2 ist somit Teil einer Gruppe von Genen, welche durch elektrophile Xenobiotika aktiviert werden können. Inwieweit die Funktion von GPx2 der reinen Detoxifizierung und dem Abbau von reaktive Sauerstoffderivate (Reactive oxygen species, ROS) dient oder ob das Aufgabenspektrum des Enzyms weitaus umfassender ist, ist derzeit noch Teil kontroverser Diskussionen. Chu äußerte die Vermutung, dass eine verstärkte Expression von GPx2 Teil bzw. Folge des erhöhten Zellwachstums ist (Chu, et al., 2004). Hieraus würde folgen, dass die GPx2 auch ein präkarzinogenes Potenzial mit sich tragen könnte (Brigelius-Flohe, 2006).

Ob und in welcher Weise GPx2 eine kausale Rolle in der Karzinogenese spielt, kann derzeit noch nicht eindeutig geklärt werden. Doch ist anzumerken, dass die GPx2-KO-Maus vollkommen vital ist und nicht zur spontanen Tumorbildung neigt (Esworthy, et al., 2000). Erst nach erfolgter Inaktivierung der zweiten zytosolischen GPx (GPx1) entwickeln die Tiere eine Ileokolitis (Esworthy, et al., 2001) und Darmkrebs, wobei die Tumorigenese abhängig vom Vorhandensein von Darmbakterien ist (Chu, et al., 2004).

Der Großteil aller Colontumore beruht auf einer Dysregulation im Wnt/ β -Catenin- Signalweg, wodurch Gene der TCF/Lef-Familie konstitutiv exprimiert werden, was ein stetiges Proliferieren mit sich bringt. Eine Studie zeigte GPx2 als eines der Zielgene des β -Catenin/TCF-Komplexes (Kipp, et al., 2007). Dieses erklärt die verstärkte Expression von GPx2 in Tumoren wie auch in der proliferativen Zone der Krypte. Sobald der Tumor in Folge der voranschreitenden Karzinogenese die β -Catenin-Abhängigkeit verliert (Morin, et al., 1996), wird auch dessen Expression vermindert, was das von Frau Prof. Brigelius-Flohé als transiente Expression der GPx2 beschriebene Phänomen erklären könnte. GPx2 erscheint unter dieser Überlegung daher nicht essenziell für die Proliferation von Tumoren. Berücksichtigt man die Beobachtung, dass die GPx-doppel-KO-Maus (GPx1, GPx2) Tumore entwickelt (Esworthy, et al., 2001), hingegen das Vorhandensein bereits eines GPx2-Allels diese Entwicklung verhindert (Esworthy, et al., 2005), ist zu vermuten, dass es sich im Falle der GPx2 um eine Art GPx1-Backup-System handelt. Die ubiquitär exprimierte GPx1 ist ein Enzym, welches sehr niedrig in der Hierarchie der Selenoproteine steht. Die mRNA wird also in Selenmangel-Zeiten nicht vollständig translatiert und kann durch NMD degradiert werden (Moriarty, et al., 1998). GPx2 hingegen steht sehr hoch in der Hierarchie, eine Synthese des Proteins ist somit auch bei lokalem Selenmangel möglich (Bermano, et al., 1995; ; Brigelius-Flohe, 1999; ; Wingler, et al.,

1999). Dieser zusätzliche Schutz kommt nur Zellen zugute, welche sich im proliferierenden Stadium befinden. Diesen Schluss lassen Untersuchungen von Kipp und Yan vermuten. Kipp wies nach, dass GPx2 eines der Zielgene des β -Catenin ist und folglich auch eine β -Catenin/TCF-Bindungsstelle im Promotor trägt (Kipp, et al., 2007). Yan hingegen konnte zeigen, dass p63 (vor allem die deltaN p63-Variante) Einfluss auf die Expression von GPx2 hat (Yan and Chen, 2006). Dieser Faktor wird vor allem in epidermalen Stammzellen gebildet und weist auf den dedifferenzierenden Status oder den Stammzellursprung der GPx2 überexprimierenden Tumorzellen im Darm hin (Suh, et al., 2006; Yang, et al., 1999).

Interessanterweise kann im Falle von HT29-Zellen die Menge an GPx2-mRNA verringert werden (10 nM zu 100 nM Selenit; $p = 0,08$). Hierbei bleibt unklar, ob diese verringerte Expression ein Resultat der verringerten β -Catenin oder der Nrf2-Aktivität ist. Da beide Prozesse (Proliferation, Inflammation) prokarzinogene Wirkungen haben, erscheint ein therapeutischer Einsatz von Selen denkbar. Derzeit wird Selen versuchsweise in der adjuvanten Krebstherapie eingesetzt, wobei der molekulare Mechanismus dieser unterstützenden Therapie noch nicht geklärt ist (Berger and Shenkin, 2007).

Eine Selen-Substitution 60 Tage alter APCmin-Tiere könnte diese Theorie verifizieren. In diesem Alter haben sich in den Mäusen bereits einzelne kleine Adenome gebildet (< 2 mm, vergleiche mit Abbildung 5.12).

6.2. Tierexperimentelle Arbeiten

Der Hauptteil dieser Arbeit beschäftigte sich mit dem Einfluss von SePP auf die Tumorentstehung und das Tumorstadium im Intestinaltrakt der Maus. Diese Fragestellung unterschied sich von den bislang in der Literatur beschriebenen Selen-Supplementations- und Depletionsstudien durch ihren genetischen Ansatz, welcher es erlaubte, zwischen der noch immer diskutierten pharmakologischen Wirkung des Selens als niedermolekulare Substanz und der enzymatischen Wirkung als Selenoprotein zu unterscheiden (Abdulah, et al., 2005; Irons, et al., 2006; Rayman, 2005).

Die Inaktivierung eines SePP-Alleles bewirkt eine negative Beeinflussung des Selenmetabolismus und führt in vielen Geweben zu einer moderat verringerten Selenkonzentration. Diese suboptimale Selenversorgung hat zur Folge, dass auch die Enzymaktivitäten der Selenoproteine erniedrigt sind (Schomburg, et al., 2003). Diese Rahmenbedingung eines suboptimalen Selenmetabolismus erscheint näherungsweise auch auf den Menschen übertragbar, da bereits funktionale SNPs im SePP-Gen beschrieben sind, die eine reduzierte SePP-Expression, abhängig vom individuellen Genotyp, bedingen (Al-Taie, et al., 2002; Meplan, et al., 2007). So auch zeigen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, dass der Selenstatus gut mit dem SePP-Gehalt im Serum korreliert.

Bei den APCmin-Mäusen handelte es sich um ein molekular intensiv charakterisiertes und für die Untersuchung intestinaler Tumore häufig verwendetes Mausmodell (Clarke, 2007; de Lau, et al., 2007; Moser, et al., 1995; Moser, et al., 1990; You, et al., 2006). Die mit diesem Tumormodell generierten Daten erscheinen auch für den Menschen relevant, da über 80 % aller intestinalen Tumore auf eine Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges zurückzuführen sind (Morin, et al., 1996). Hingegen ist die Lokalisation der Tumore im murinen Modell ein zu-

weilen erwähnter Kritikpunkt. Im menschlichen Darm ist vor allem der Colon von Tumoren betroffen. Dies gilt auch für FAP-Patienten, welche - ähnlich der APC^{min}-Maus - nur noch ein funktionstüchtiges APC-Allel tragen (Friedrich and Kullmann, 2003; ; Galiatsatos and Foulkes, 2006). Ungleich zum Menschen entwickeln die APC^{min}-Tiere ca. 90 % aller ihrer Tumore im Dünndarm, während im Colon nur vereinzelte Tumore beobachtet werden.

In einem ersten Ansatz galt es daher, APC^{min}-Tumore des Dünndarms mit humanen Colontumoren im Hinblick auf ihre Expression und Regulation von Selenoproteinen (Angaben aus der Literatur (Al-Taie, et al., 2004; ; Mork, et al., 2000)) zu vergleichen. Es zeigte sich eine weitgehende Übereinstimmung im Expressionsmuster der intestinalen Tumore beider Spezies. Mörk berichtet von einem SePP-mRNA-Abfall um das ca. 9-fache und von einer annähernd um das 5-fache erhöhten Expression der GPx2 bei Vergleichen von humanen Adenomen mit Mukosagewebe (Mork, et al., 2000). Folgeuntersuchungen in Tumorproben aus dem Colon konnten diesen Trend bestätigen (Al-Taie, et al., 2004). Unsere Northern Blot-Analysen der murinen APC^{min}-Adenome des Dünndarms zeigten ein sehr ähnliches Bild. SePP-mRNA war um das 5-fache erniedrigt, hingegen war die mRNA-Expression von GPx2 6-mal höher als in der umliegenden Mukosa (Darmepithel). Dies legt nahe, dass das APC^{min}-Modell ein gut geeigneter Organismus ist, um eine Selenresponsivität intestinaler Tumore zu untersuchen.

Die Verkreuzung beider Mauslinien (APC^{min} x SePP) verlief erfolgreich, und die nach der Mendelschen Vererbungslehre erwartete Anzahl transgener Nachkommen konnte reproduzierbar gezüchtet werden. Allerdings konnten die Analysen nicht auf die APC^{Min/+}/SePP^{-/-}-Tiere ausgedehnt werden, da aufgrund ihres generell schlechten Gesundheitszustandes diese Tiere weit vor dem Versuchsende (120 Tagen) verstarben oder getötet werden mussten. Dies war nicht primär ein Resultat der Tumorentwicklung, sondern vielmehr des gestörten Selenstoffwechsels, welcher bereits für die SePP^{-/-}-Maus beschrieben wurde (Schomburg, et al., 2003).

Um dennoch die Auswirkungen eines totalen SePP-Verlustes im APC^{min}-Modell abzuschätzen, wurde ein APC^{Min/+}/SePP^{-/-}-Tier mitsamt einem APC^{Min/+}-Geschwistertier zu einem deutlich frühen Zeitpunkt (60 Tage alt) getötet und analysiert. Hier zeigte sich gegenüber dem APC^{Min/+}-Wurfgenossen eine Verfünffachung der Tumoranzahl in dem APC^{Min/+}/SePP^{-/-}-Tier. Auch wenn aufgrund des jungen Alters die Tumore relativ klein (nicht größer als 3 mm im Durchmesser) waren, entwickelten sich doch in der APC^{Min/+}/SePP^{-/-}-Maus deutlich größere Tumore. Setzte man die Anzahl der jeweiligen Tumorgößen ins Verhältnis zur Gesamtumorzahl, zeigte sich kein deutlicher Trend von schneller wachsenden Tumoren. APC^{Min/+}/SePP^{-/-}-Mäuse scheinen lediglich eine erhöhte Tumorzinidenz zu haben, nicht aber ein makroskopisch erhöhtes oder beschleunigtes Tumorzwachstum. Es sei angemerkt, dass diese Interpretation leider nur auf der Analyse zweier Geschwistertiere basiert, und deshalb der Verifikation bedarf. Nichtsdestotrotz stellen die einzelnen Tumore singuläre Verluste des APC-Tumorsuppressorgens dar und repräsentieren deswegen eine Vielzahl von Einzelereignissen.

Gegenüber dem totalen Verlust an SePP erschienen die SePP-heterozygoten-Mäuse als das physiologisch interessantere Modell, da sie sich gut mit der Stoffwechsellaage von Menschen mit einem moderaten Selenmangel bzw. mit einer weniger vorteilhaften genetischen Ausstattung für einen effizienten Selenmetabolismus vergleichen lassen.

Wie bereits erwähnt, hatten SePP^{+/-}-Mäuse nur eine leicht gestörte Selenverteilung im Körper, die sie phänotypisch nicht von ihren Wildtyp-Artenossen unterscheiden ließ. Sie erfreuten sich eines normalen Wachstums und hatten keinerlei gesundheitliche Auffälligkeiten (Schomburg, et al., 2003; Schweizer, et al., 2004). Auch das Einkreuzen eines APC^{min}-Allels in die SePP-Linie hatte bis auf eine leichte Wachstumsretardation, welche SePP unspezifisch war, keine offensichtlichen Auswirkungen.

Trotz dieser nur milden Beeinflussung des Selenmetabolismus und Selenstatus waren die Auswirkungen auf die intestinale Tumorigenese stark ausgeprägt. Dieser Befund stellt den ersten deutlichen physiologischen Phänotyp bei den SePP-heterozygoten Tieren dar, den man auch als "Haploinsuffizienz von SePP im APC^{min}-abhängigen Tumormodell" klassifizieren kann. Dies zeigte sich nicht nur in einer gesteigerten Tumorzinzidenz (46 %; p<0,05) bei den heterozygoten Tieren, vielmehr waren APC^{Min/+}/SePP^{+/-}-Tiere von einer 3-fach-höheren Tumormast betroffen. Dieses stärkere Tumorstuchstum wird ersichtlich, indem man Tumorzahl und Tumorstuchstum ins Verhältnis zum jeweiligen Tiermodell setzt. Hierbei können Tumorzinzidenz und Tumorstuchstum von einander „entkoppelt“ werden. Abbildung 6.2 veranschaulicht diese Berechnung. Hierzu wurde die Tumorzahl in den einzelnen Tumorstuchstumsgrößenkategorien ins Verhältnis zur gesamten Tumorzahl im jeweiligen Genotyp aufgetragen (Säulendiagramm der Tumorstuchstumsgrößenkategorien). Diese Darstellung veranschaulicht, dass in den APC^{Min/+}/SePP^{+/-}-Tieren die größeren Tumore aller Wahrscheinlichkeit nach nicht das Resultat einer früher einsetzenden Tumorzinzidenz darstellen und somit die Tumore längere Zeit zum Wachsen hatten, sondern eher auf ein besseres Volumenwachstum bei Abwesenheit eines SePP-Allels zurückzuführen sind. Demgegenüber erscheint bei einem kompletten SePP-Verlust (APC^{Min/+}/SePP^{-/-}) lediglich die Tumorzinzidenz erhöht (siehe Abbildung 6.2). Graphisch lässt sich dies ableiten, wenn man aus den Tumorstuchstumsgrößenkategorien der beiden zu vergleichenden Genotypen den Quotienten bildet (rote Kreuze, mit roter Trendlinie). Im Vergleich APC^{Min/+}/SePP^{+/-} gegen APC^{Min/+}-Kontrolltieren zeigt sich keine Veränderung der Quotienten, folglich ist die makroskopische Tumorstuchstumsprogression einzelner Tumore in beiden Genotypen sehr ähnlich. Stellt man den Vergleich APC^{Min/+}/SePP^{+/-} gegen APC^{Min/+} auf, wird deutlich, dass das Tumorstuchstum sichtlich erhöht ist, und zwar unabhängig von der Tumorzinzidenz.

Die histologischen Untersuchungen zeigten, dass diese Eigenschaft nicht nur auf das Wachstum beschränkt ist. Tumore in APC^{Min/+}/SePP^{+/-} haben die offensichtliche Tendenz, undifferenzierter und damit auch aggressiver zu sein. Hiermit dürfte auch eine erhöhte Proliferationsrate verbunden sein, die sich allerdings in der Genchip-Analyse oder den qRT-PCR-Studien nicht klar nachweisen ließ.

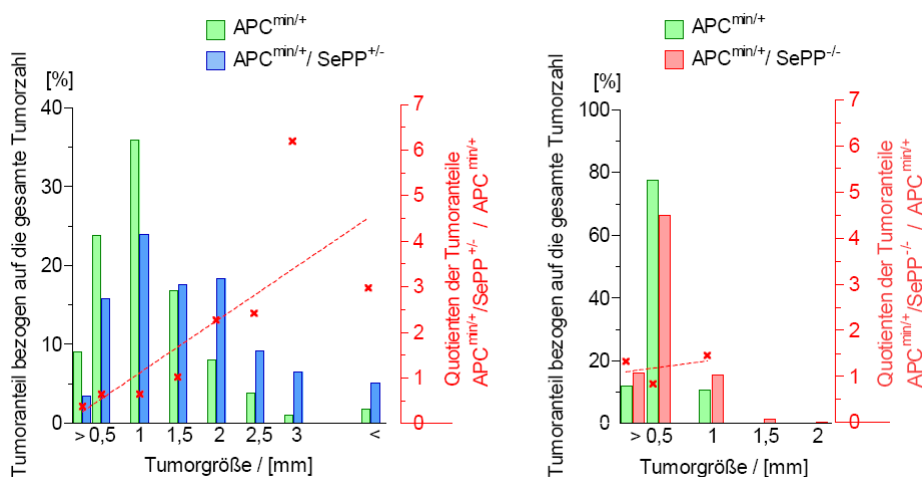


Abbildung 6.2: Anteilige Tumorverteilung: Die Anzahl der Tumore der einzelnen Größenfraktionen wurde, innerhalb eines Genotyps, auf die gesamte Tumoranzahl bezogen (Balkendiagramm). – Hierbei zeigte sich, dass die Verteilung der Tumorgrößen, unabhängig von der gesamten Tumoranzahl, durch Deletion eines SePP-Allels deutlich in Richtung größerer Tumore verschoben war. Dieses Bestreben zu schneller wachsenden Tumoren war bei den SePP-KO-Tieren nicht festzustellen. Zur Verdeutlichung dieses Trends, wurde die „anteilige Tumorverteilung“ auf die jeweiligen Kontrolltiere bezogen (rote Sternchen). Die Trendanalyse der einzelnen Quotienten (rote gestrichelte Line) veranschaulicht die Tendenz SePP-heterozygoter Tumore, deutlich schneller zu wachsen. Dieser Trend ist bei totalem Verlust an SePP nicht ersichtlich. (Für die Erhebung der Daten wurden die Werte von Abbildung 5.10 bzw. 5.12 zugrunde gelegt).

Grundlage zur Verkreuzung der APCmin-Maus mit dem Modell der genetisch induzierten Selendefizienz (SePP) war die Hypothese, dass ein präventiver Effekt von Selen auf den Darmkrebs durch Selenoproteine und den Selenmetabolismus vermittelt wird und nicht durch pharmakologische Effekte hoher Konzentrationen von Selenverbindungen. Die Versuchstiere wurden auf normaler Haltungsdiät gezüchtet. Das hierin enthaltene Selen war vor allem pflanzlichen Ursprungs und lag somit hauptsächlich als SeMet vor. Bei dieser Verbindung handelt es sich um einen Selenether (-C-Se-C-). Selen liegt hierbei in der Oxidationsstufe (-II) vor. Ungleich zum SeCys ist die Möglichkeit einer Deprotonierung unter physiologischen Bedingungen nicht gegeben. Auch ist das Redoxpotential im Vergleich mit Verbindungen wie Selenit ($\text{Se}(+\text{IV})\text{O}_3^{2-}$) ungleich geringer. Um etwaiger pharmakologischer Wirkungen von Selenverbindungen im Futter zu minimieren bzw. auszuschließen ist SeMet bestens geeignet.

Die Resorption von SeMet erfolgt im Dünndarm und die physiologische Verwertung erfolgt abhängig vom Methioninstatus. Der Körper ist nicht in der Lage, zwischen beiden Aminosäuren zu diskriminieren. Beide Aminosäuren konkurrieren somit um den gleichen Transportweg und die gleichen Kodons bei der Proteinbiosynthese. In der Zelle kann SeMet als Selenquelle genutzt werden, wodurch Selenid (als $\text{H}_2\text{Se}(-\text{II})$) entsteht, welches für die spezifische Bildung von Selenophosphat und Selenoproteinen zur Verfügung steht (siehe Einleitung 1.4). Im Gegensatz zu SeCys, welches nur nach der katabolen Verstoffwechselung und der Resynthese an der Seryl-beladenen tRNA wieder zur Proteinbiosynthese genutzt werden kann, erscheint der SeMet-Metabolismus weniger stark von echten Selenoproteinen wie SePP abhängig. Gerade der Transport innerhalb des Körpers kann bei SeMet unabhängig von SePP erfolgen, da es in alle Proteine je nach Verfügbarkeit und Methioninstatus eingebaut wird. Somit unterscheiden sich $\text{SePP}^{+/-}$ - und Wildtyp-Mäuse hauptsächlich im Selenoproteinstoffwechsel und SePP-abhängigen Selen-transport, nicht aber so sehr im SeMet-Stoffwechsel. Deshalb dürfte die Beeinflussung der Tumorigenese in der SePP x APCmin-Verkreuzung maßgeblich, wenn nicht sogar ausschließlich, durch die Biosynthese von Selenoproteinen zu erklären sein. Die hier vorgestellte Arbeit stellt somit eines der ersten Modelle dar, in welchem eine direkte Wirkung von Selenoproteinen auf die Tumorigenese gezeigt wird, die vom Selenoprotein-Metabolismus des Individuums abhängt, nicht aber auf diätetischen Interventionen beruht. Folglich muss in diesem Fall keine enigmatische physiologische Funktion von pharmakologischen Konzentrationen niedermolekularer Selenverbindungen postuliert werden, vielmehr liegen diesen tumorrelevanten Effekten die veränderte Biosynthese und der Turnover von echten Selenoproteinen als molekularer Mechanismus zugrunde.

Der Unterschied in der Tumorigenese zwischen den APC^{Min/+}/SePP^{+/-}-Mäusen und APC^{Min/+}-Tieren war nicht hauptsächlich in der Tumorinzidenz begründet (1,5; $p < 0,05$), sondern die molekulare Qualität der Tumore unterschied sich auch bei gleicher Größe deutlich. Dies wurde durch die histopathologische Analyse des Grades der Differenzierung deutlich. Aus diesem Befund ergab sich als nächstes Ziel, diese histopathologischen Unterschiede auf molekulargenetischer Ebene nachzuvollziehen. Hierfür wurde die transkriptomweite Analyse mittels Microarray gewählt, um ein möglichst unvoreingenommenes und umfassendes Bild zu gewinnen.

Trotz eines solch globalen Ansatzes war nicht zu erwarten, einzelne Gene als entscheidend verantwortlich für die Ausprägung der Unterschiede in einem solch komplexen Prozess wie der Tumorigenese zu identifizieren. Nach der Theorie der Somatischen Evolution (Beerenwinkel, et al., 2007; ; Morin, et al., 1996; ; Nowak, et al., 2002) ist davon auszugehen, dass jeder einzelne Tumor eine individuelle Entwicklung durchläuft, was sich in Morphologie, Differenzierungsgrad, Wachstum, Invasivität und verändertem Genexpressionsprofil widerspiegelt. Trotz intensiver Bemühungen in der Krebsforschung ist bis heute nur in Ansätzen verstanden, welche molekularen Veränderungen für das Krebswachstum essenziell sind. Bereits Punktmutationen in verschiedenen Domänen des gleichen Tumorsuppressorgens können zu deutlichen Unterschieden in Tumorinitiation und Differenzierung führen, was am Beispiel des APC gezeigt wurde (Ficari, et al., 2000; ; Oshima, et al., 1995; ; Smits, et al., 1997; ; Smits, et al., 1999).

Die Tatsache, dass praktisch alle Tumore in den APC^{Min}-Tieren auf eine Inaktivierung des zweiten Allels des Tumorsuppressorgens APC zurückzuführen sind, stellt bereits eine deutliche Vereinfachung dar, die ein relativ homogenes Spektrum an Adenomen entstehen lässt. Somit ist dieses genetische Tumormodell den chemisch induzierten Ansätzen aufgrund der besseren Homogenität vorzuziehen.

Die Analyse der Genprofile machte deutlich, dass beide Tumorarten (APC^{Min/+} vs. APC^{Min/+}/SePP^{+/-}) molekular gesehen sehr ähnlich waren. Von den ca. 28.000 im Tumor exprimierten Genen/ESTs waren lediglich 280 um einen Faktor $>2,0$ verändert. Ein globaler Vergleich der Array-Daten mit Daten einer Adenom-Karzinom-Sequenz im gleichen Modellorganismus (Paoni, et al., 2003) zeigte keine sinnvollen Übereinstimmungen. Hieraus ist abzuleiten, dass das weniger differenzierte Erscheinungsbild der APC^{Min/+}/SePP^{+/-}-Tumore nicht auf ein deutliches Vorschreiten in der Karzinomsequenz zu einer anderen Qualität des Tumors zurückzuführen ist. Die Analyse einzelner Ziel-Gene der TCF/Lef-Transkriptionsfaktorfamilie (CcnD1, cMyc, JunD1) zeigte keine konsistente Aktivierung dieses Wnt/ β -Catenin-Signalwegs.

Von den 55 mittels Real time-PCR validierten Genen zeigten sich 7 als konsistent unterschiedlich exprimiert ($p < 0,05$). Es fällt auf, dass ein überwiegender Teil der Gene mit Inflammation bzw. Immunantwort assoziiert werden konnte.

Die Korrelation zwischen Inflammation und Tumorwachstum ist in der Literatur durch zahlreiche Studien am Menschen und am Tier belegt (Itzkowitz and Yio, 2004; ; Perwez Hussain and Harris, 2007; ; Takahashi and Wakabayashi, 2004; ; Tanaka, et al., 2006).

Eine erhöhte Aktivität inflammationsabhängiger Marker in den SePP^{+/-}-Tieren konnte auch in weiteren Studien unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden. Die einmalige Gabe von Lipopolysaccharid (inter peritoneal) zeigte im

Darm bei reduzierter SePP-Expression eine deutlich erhöhte Reaktion proinflammatorischer Zytokine gegenüber Wildtyptieren. In diesem Versuchsaufbau zeigte sich auch wiederum die GPx2 deutlich verstärkt exprimiert.

Anhand dieser Übereinstimmung der inversen Regulation von SePP und GPx2-mRNA in den Tumoren und nach induzierter Inflammation im Darm stellt sich die Frage nach Ursache und Wirkung: Ist aufgrund der erhöhten Neigung zur Inflammation die Bildung von Tumoren begünstigt, oder sind die Tumore Auslöser einer erhöhten lokalen Inflammation? Denkbar wären auch parallele Prozesse mit synergistischer Beeinflussung, was erhöhte Tumorzinzidenz bzw. Tumorstachstum zur Folge haben könnte.

Um einen besseren Einblick in die molekularen Mechanismen der Tumorentstehung zu erlangen, könnte durch Gabe von nicht-steroidbasierten Entzündungshemmern (Non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAID) die Inflammation in den APC^{Min/+}/SePP^{+/-} minimiert werden. Eine generelle Wirkung von NSAID auf die Tumorigenese im Darm konnte bereits in zahlreichen Arbeiten dargelegt werden (Eisinger, et al., 2007: ; Wang and DuBois, 2007). Die Wirkung beruht auf einer irreversiblen Hemmung der Cyclooxygenasen, welche für die Zyklisierung von Arachidonsäure und damit für die Bildung der Inflammationsvermitteldn und tumorstachstumfördernden Prostaglandine notwendig sind. Hierbei wird vor allem die Bedeutung von PGE2 herausgestellt (Castellone, et al., 2005). Gene, welche diesem Stoffwechselweg zugeordnet werden können, zeigten aber in den hier vorgestellten Analysen keine signifikanten Änderungen der mRNA-Expression (Ptges2, Cox2, Pparg).

Hingegen waren Gene, welche mit der Akutphasereaktion assoziiert werden, in den APC^{Min/+}/SePP^{+/-}-Tumoren deutlich erhöht. Zu nennen sind diesbezüglich Il6 (2,5; p<0,05), Saa1 (3,9; p=0,06), Saa3 (2,0; p<0,05) und Mtl1 (1,8; p<0,01). Außerdem könnte man auch die durch LPS induzierbare GPx2 (1,8; p<0,001) zu diesen Akutphaseproteinen rechnen. Es lässt sich also vermuten, dass gewebeständige Immunzellen stärker aktiviert wurden, oder eine erhöhte Zahl solcher Immunzellen in die Tumore eingewandert ist.

Die histologischen Färbungen von Mastzellen in den Tumorschnitten schienen diese Vermutung zu bestätigen (siehe Abbildung 5.17), bedürfen jedoch der Verifikation in einer größeren Anzahl an Schnittpräparaten weiterer unabhängiger Maustumore.

Vergleicht man aber das nicht-neoplastisch veränderte Gewebe beider Mauslinien, so zeichnet sich hier bereits ein deutlicher Trend zur erhöhten Akutphase-Reaktion ab. Die mRNA von Saa1 (8,9; p<0,05), Saa2 (106; p<0,05), Saa3 (3,7; p=0,1), TNF α (4,1; p=0,08) und Timp2 (4,6; p<0,01) zeigten im Darm von APC^{Min/+}/SePP^{+/-}-Tieren deutlich erhöhte Konzentrationen.

Die vermehrte Expression von Akutphase-Genen könnte direkt zu einer verstärkten Proliferation führen, was die verstärkte Expression des β -Catenin unabhängigen Zellzyklus-Gens Ccnc (1,3; p<0,05) wie auch die Erhöhung des Angiogenesemarkers Ang1 (1,5; p<0,05) (Etoh, et al., 2000) erklären könnte. Bei großen Tumoren kann in dieser Hinsicht auch eine signifikant verstärkte Bildung von Wachstumsfaktoren der IGF-Achse festgestellt werden (vergleiche hierzu Tabelle 5.4).

Das Ausmaß der Veränderungen im Expressionsniveau der einzelnen Gene erscheint relativ gering. Bedenkt man aber, dass diese nur leicht erhöhte Expression über mehrere Monate, in denen die Tumore wachsen, andauern kann, so lässt sich das deutlich bessere Tumorstachstum in den APC^{Min/+}/SePP^{+/-}-Tieren plausibel erklären. Nichtsdestotrotz werden weitere Analysen auf Proteinebene und funktionelle Studien in Zellkultur folgen müssen, um die

beobachteten Veränderungen im Hinblick auf ihre Bedeutung für die Seleneffekte in der Tumorigenese einordnen zu können.

Welche Selenoproteine nun aber einen direkten Einfluss auf die Tumorentwicklung und das Tumorwachstum haben, konnte in dieser Arbeit nicht endgültig geklärt werden. Im Falle des SePP war bereits bekannt, dass das Protein neben der Selentransport-/Speicherfunktion (Hill, et al., 2003; ; Schomburg, et al., 2003; ; Schweizer, et al., 2005) sowohl schwermetallbindende Eigenschaften (Suzuki, et al., 1998; ; Yan and Barrett, 1998) als auch eine Peroxidase-Aktivität (Arteel, et al., 1998; ; Takebe, et al., 2002) hat. Im Falle der Tumorigenese ist die letztere Eigenschaft besonders interessant. Die schädigende Wirkung freier Radikale ist in der Literatur gut belegt (Droge, 2002; ; Hussain, et al., 2003; ; Valko, et al., 2004; ; Valko, et al., 2007). Im Falle von SePP könnte, dass das extrazelluläre Protein seine antioxidative Wirkung in der Darmschleimhaut entfalten und so den Darm vor schädigenden Einflüssen aus dem Nahrungsbrei schützen kann.

Dem widersprechend ist festzustellen, dass die Peroxidase-Aktivität deutlich geringer ist (Faktor 100) als die der anderen zytosolischen bzw. extrazellulären GPx-Enzyme (Takebe, et al., 2002). Gegen eine direkte Wirkung von SePP spricht auch, dass SePP vermutlich zumeist von adultem Darmgewebe gebildet wird. Dieser Vermutung liegt zugrunde, dass SePP im Tumorgewebe vermindert exprimiert wird und dass im APCmin-Modell die Tumoringenese und das Tumorwachstum von deregulierten Zellen aus der proliferativen Zone in den Krypten des Darms ausgehen. Es sei auch angemerkt, dass das Expressionsmuster von Adenomen eher den Wnt/ β -Catenin-abhängigen proliferierenden Zellen ähnelt als dem ausdifferenzierten Darmgewebe. Aufgrund der räumlichen Trennung zwischen SePP-exprimierendem-adultem Gewebe und proliferierender Zone erscheint ein direkter Einfluss von SePP als nicht plausibel. Auch die GPx-Aktivität von SePP ist – zumindest *in vitro* - deutlich geringer als im Vergleich zu den anderen selenabhängigen GPx (GPx3, GPx1, GPx2), was eine ROS-abbauende Funktion im Darm unwahrscheinlich macht. Aus Sicht der Selen-Ökonomie stellt sich die grundlegende Frage, warum das seltene Spurenelement überhaupt in Form von SePP mit seinem eigenen Recycling-Mechanismus in den Darm sezerniert werden sollte. Gerade SePP mit der höchsten Selendichte im C-Terminus erscheint für eine ausschließlich enzymatische Funktion nicht als geeignete Wahl, wenn zugleich das Spurenelement in nur limitierenden Mengen vorliegt.

Ein Teilaspekt der Arbeit war auch die Bestimmung der Aktivität von Selenoenzymen in den einzelnen Darmsegmenten in Abhängigkeit vom SePP-Status. Hier zeigte sich, dass der Darm nur zu einem gewissen Grad in der Lage ist, sich selbst mit dem aus der Nahrung aufgenommenen Selen zu versorgen.

Generell stellt nach derzeitiger Datenlage die Leber das Hauptverteilungsorgan des Selens im Körper dar. Das durch den Darm aufgenommene Selen wird in der Leber organifiziert und in Form des in die Blutbahn sezernierten SePP an die unterschiedlichen Organe geliefert. Dies konnte für Organe wie Niere, Hirn und Hoden gezeigt werden (Schomburg, et al., 2003). Erstaunlicherweise ist auch der Darm ein Organ, welches, in Hinblick auf die Selenverteilung, peripher zur Leber steht. Diese Erkenntnis gilt vor allem für den distalen Abschnitt des Darms, welcher auch bei Verlust eines SePP-Allels den größten Anstieg im Tumorwachstum zeigte. Im Falle des Hodens konnte gezeigt werden, dass eine leberspezifische transgene Expression von SePP die Funktion des Organs und die Spermiogenese wieder herstellt (Renko, et al., 2008). Es stellt sich die Frage, wie stark auch der Darm und die intestinalen Selenoproteine von der hepatischen SePP-Produktion beeinflusst werden können. Falls hier eine strenge und

funktionelle Abhängigkeit besteht, dann könnte dieser Zusammenhang auch eine Erklärungshilfe für die erhöhte Tumoranfälligkeit im Darm bei einer Belastung der Leber durch Alkoholmissbrauch bzw. Transplantation darstellen (Mizoue, et al., 2006; Vallejo, et al., 2005).

Zur Messung der Selenoenzyme im Darm ist weiterhin anzumerken, dass hierbei der enzymatische Test der Analyse mittels Western Blot vorzuziehen ist. Dies ist darin begründet, dass alle selenabhängigen Mitglieder der TxnRd-Familie das SeCys am Ende des Proteins tragen (Kryukov, et al., 2003) und die Aktivität von Selenoenzymen von der Gegenwart des SeCys abhängig ist. Da aber auch bei fehlendem SeCys ein Protein von anscheinend normaler Größe im Immunoblot detektiert wird, ist es so nicht möglich, zwischen maturen Selenoproteinen und trunkierten inaktiven Formen zu unterscheiden.

Die Messung der Aktivitäten der Selenoenzyme im Darm erfolgte in gesunden SePP-Tieren. Hierdurch konnte einer krankheitsbedingten Veränderung des Expressionsmusters der Selenoproteine, ausgelöst durch Tumorstadium und responsive Immunantwort, vorgebeugt werden.

Bei den enzymatischen Messungen fällt auf, dass die Aktivität der GPx in den heterozygoten SePP-Mäusen gegenüber den Wildtyp-Tieren deutlich erniedrigt ist. Dieses reduzierte Aktivitätsniveau wird auch durch einen totalen Verlust von SePP nicht signifikant weiter abgesenkt (siehe Abbildung 5.20). Generell muss deshalb festgestellt werden, dass der verwendete enzymatische Test es nicht erlaubt, direkt zwischen GPx2 und GPx1 zu diskriminieren. Da die GPx2 in der Hierarchie der Selenoproteine sehr weit oben steht, also durch eine leichte Selendefizienz kaum in ihrer Aktivität verändert wird, ist anzunehmen, dass der überwiegende Verlust an gemessener GPx-Aktivität der zellulären GPx1 zuzuordnen ist. Dieses ist eines der Selenoproteine, welches unter selenarmen Bedingungen sehr deutlich an Aktivität einbüßt. Wie bereits oben erwähnt, hat ein totaler Verlust von einem der beiden im Darm exprimierten GPx-Isoenzyme keine direkten physiologischen Auswirkungen auf den Organismus (Esworthy, et al., 2001). Wobei anzumerken ist, dass in diesen Studien die Tiere keinem weiteren Tumor-induzierenden Stress ausgesetzt wurden. Der Verlust von beiden zytosolischen selenabhängigen Peroxidasen (GPx1, GPx2) führte hingegen direkt zu neoplastischen Neubildungen (Esworthy, et al., 2001), so dass auch die nach SePP-Verlust gemessene graduelle Reduktion der Expressionsniveaus beider Isoenzyme als bedenkliche Parallelentwicklung eingestuft werden muss.

Im Falle der TxnRd-Aktivität war in der SePP^{+/-}-Maus keine Veränderung gegenüber den Wildtyp-Tieren festzustellen. Hier handelte es sich um Selenoenzyme, die auch unter moderaten selenarmen Gegebenheiten noch aktiv und gut exprimiert waren (vergleiche hierzu Abbildung 5.18). Einzig nach Verlust beider SePP-Allele in der SePP^{-/-}-Maus war die Aktivität erniedrigt. Stellt man hierzu eine Korrelation zwischen den TxnRd-Enzymaktivitäten und den Tumorzinzenzen bzw. Tumorstadien auf, kann über die möglichen Ursachen spekuliert werden.

So lässt sich im Falle der APC^{Min/+}/SePP^{-/-}-Tiere vermuten, dass neben der verminderten Aktivität der GPx1 und TxnRd auch die Aktivität der ebenfalls hoch in der Selenoprotein-Hierarchie stehenden GPx2 betroffen ist. Sollte sich herausstellen, dass es sich bei diesem Enzym tatsächlich um ein Schutzenzym für proliferierende epidermale Zellen handelt, wie oben bereits ausgeführt, könnte dies die erhöhte Tumorzinzenz bei totalem SePP-Verlust erklären, da eine höhere Anzahl mutagener Ereignisse zu postulieren wäre.

In dem physiologisch relevanteren Modell des partiellen SePP-Mangels fällt das Missverhältnis zwischen TxnRd-Aktivität und GPx-Aktivität auf. Es ist zu vermuten, dass diese Diskrepanz zwischen beiden Enzymsystemen mitverantwortlich für das verstärkte Tumorstadium in den APC^{Min/+}/SePP^{+/-}-Tieren ist. Im Falle der TxnRd ist bekannt, dass eine vermehrte Expression eine tumorstadiumsfördernde Wirkung hat (Arner and Holmgren, 2006: ; Nordberg and Arner, 2001). Weitergehend, wird eine krebstadiumsfördernde Wirkung freier Radikale und erhöhter ROS-Konzentrationen immer wieder diskutiert (Pervaiz and Clement, 2007: ; Wu, 2006). Die reduzierte GPx-Expression könnte in diesem Zusammenhang entscheidend für einen solchen Signalweg und die resultierende tumorstadiumsfördernde Wirkung des geringeren Selenstatus in den APC^{Min/+}/SePP^{+/-}-Mäusen beitragen. Tierexperimentelle Arbeiten der Arbeitsgruppe Hatfield bestätigen diese Vermutung. Dort konnte gezeigt werden, dass proliferierendes Lebergewebe gegenüber nicht-neoplastisch verändertem Gewebe ein reziprokes Verhältnis der GPx versus der TxnRd-Expressionen aufweist (Gladyshev, et al., 1998). Hierbei bleibe die Beobachtung nicht unerwähnt, dass der Darm SePP-heterozygoter Mäuse generell tendenziell größer und länger erschien. Diese Beobachtung wird in der Weise unterstützt, dass in nicht-tumorstadiums verändertem Gewebe in den APC^{Min/+}/SePP^{+/-}-Tieren deutlich verstärkt IGF1 exprimiert wurde (4,4; p<0,05). Die lässt sich auch auf die Bindungsproteine des IGF1 übertragen (IGFBP1: 4,8; p<0,01; IGFBP2: 4,1; p<0,01) (siehe Tabelle 5.5). Im Vergleich von APC^{Min/+}/SePP^{+/-}- gegen APC^{Min/+}-Tumore war kein signifikanter Unterschied, aber doch ein deutlicher Trend zu erkennen (IGF1 2,1^{p=0,1}). Hier ist also neben der autokrinen Versorgung auch ein parakrines Einwirken auf den Tumor denkbar, welches zu einem verstärkten Wachstum führen könnte. Die generelle Wirkung des IGF-Systems auf das Tumorstadiumswachstum ist in der Literatur gut belegt (Durai, et al., 2005) (Davies, et al., 2006: ; Foulstone, et al., 2005: ; Jerome, et al., 2003). Leider liegen noch keine Daten vor, welche einen direkten Einfluss von TxnRd auf das IGF-System zeigen.

Man kann daher vermuten, dass die erhöhte Wachstumsrate, ausgelöst durch einen partiellen Verlust der SePP-Expression und einem damit einhergehenden relativen Selenmangel im Darm, nicht nur durch verminderte Expression der GPx und der dadurch bedingten höheren ROS-Konzentrationen, sondern auch durch eine Missverhältnis in der TxnRd-Aktivität begründet werden kann.

Die präsentierten Daten legen überdies nahe, dass es zur Kontrolle des Tumorstadiumswachstums und der Tumorstadiumsprogression nicht ausreichend sein dürfte, einen normalen Selenspiegel zu haben, wie es für die Vermeidung der Tumorstadiumsinzidenz sinnvoll erscheint. Vielmehr dürfte zur Verhinderung der Entartung des Tumors eine Selenversorgung wünschenswert sein, die auch die sich in der Hierarchie der Selenoproteine am unteren Rand befindenden Selenoproteine sättigt und deren volle Expression gewährleistet.

Alternativ oder in Kombination zu dieser Theorie muss auch die räumliche Verteilung des Spurenelementes betrachtet werden. SePP kann als sezerniertes und damit mobiles Selen-Transportprotein diffundieren und rezeptorabhängig von den Zielzellen nach Bedarf aufgenommen werden. Ein Verlust der SePP-Expression behindert den zielgerichteten Transport bzw. die Verteilung von Selen. Somit ist auch denkbar, dass zwar genug Selen aus der Nahrung aufgenommen wird, es aber bei SePP-Mangel nicht ausreichend, schnell oder effektiv genug an die Zielorte gelangt, um dort die Expression funktioneller Selenoproteine sicherzustellen. So könnte es trotz gutem Selen-

status zu einem lokalen Mangel an Selen und damit an protektiven Selenoenzymen kommen und die Tumorigenese begünstigt werden.

Zusammengenommen lassen die hier präsentierten Daten vermuten, dass sowohl eine mengenmäßig insuffiziente, als auch eine transporttechnisch suboptimale Selenversorgung eine erhöhte Tumorigenese im Darm bewirken kann. Inwieweit diese Daten direkt auf den Menschen übertragbar sind, ist nicht geklärt. Derzeit läuft in der USA eine der größten Supplementationsstudien, welche als primäres Ziel die Vermeidung von Prostatakrebs hat. Sekundär werden auch viele weitere Parameter, zu denen auch Tumore des Intestinaltraktes zählen, ausgewertet. Die Ergebnisse werden mit Spannung erwartet, lassen sich aber evtl. nur eingeschränkt auf die hiesige Situation übertragen, da in den USA die Selenversorgung generell sehr viel besser als in Europa ist. Bereits im NPC-Tarif (Clark, et al., 1996); (Combs, 2001) zeigte sich, dass die Probanden im unteren Tertil des Selenstatus besonders gut von einer Selen-Supplementation profitierten. Ob diese Effekte mit einer messbaren Verbesserung der SePP-Expression im Serum oder lokal in der Prostata oder im Darm einhergehen, ist noch nicht bekannt. Entsprechend ist aber anzunehmen, dass sich ein positiver chemopräventiver Effekt in der geplanten europäischen Selen-Interventionsstudie (PREvention of Cancer by Intervention with Selenium - PRECISE) deutlich ausgeprägter zeigen dürfte und medizinisch sehr sinnvoll erscheint.

Die vorliegende Arbeit lässt auch vermuten, dass ein Mangel der Expression von Selenoproteinen zwei wahrscheinlich unabhängige Auswirkungen haben kann: Einerseits ist eine erhöhte Tumorzinzidenz zu verzeichnen. Andererseits und evtl. pathophysiologisch sehr viel relevanter, geht eine reduzierte SePP-Expression neben der moderaten Erhöhung der Tumorzahl mit einer deutlich erhöhten Tumordifferenzierung einher.

Als Marker zur Bestimmung der Selenversorgung wird normalerweise das Spurenelement selbst bestimmt, oder stellvertretend die Aktivität der plasmatischen GPx3 aus Serum oder der zytosolischen GPx1 aus Erythrozyten. Hierbei ist zu bedenken, dass das Maximum der GPx-Expression durch Selensubstitution relativ schnell erreicht ist und keinen guten Marker in Supplementationsstudien darstellt. Besser und linearer reagiert in solchen klinischen Studien oder individuellen Supplementationsversuchen sicher SePP selbst (Daten der Arbeitsgruppe). Da es sich in dieser Arbeit als funktionell bedeutend für die Tumorigenese erwiesen hat, erscheint es nicht nur als Marker wichtig, sondern als direktes funktionstragendes tumorrelevantes Biomolekül. Es bleibt zu klären, ob die Bestimmung des SePP-Status aus Blutserum/-plasma auch geeignet ist, um den SePP-Status im Darmgewebe abzubilden und damit eine Aussage zur individuellen Krebs susceptibility zu erlauben.

Literaturverzeichnis

- Abdulah, R.; Miyazaki, K.; Nakazawa, M. and Koyama, H. (2005): Chemical forms of selenium for cancer prevention, *J Trace Elem Med Biol* (vol. 19), No. 2-3, pp. 141-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16325529
- Affymetrix (2004): Array Design and Performance of the GeneChip Mouse Expression Set 430., http://www.affymetrix.com/support/technical/technotes/mouse430_technote.pdf. URL: http://www.affymetrix.com/support/technical/technotes/mouse430_technote.pdf
- Affymetrix (2004): GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array - Data Sheet, http://www.affymetrix.com/support/technical/datasheets/mogarrays_ddatasheet.pdf. URL: http://www.affymetrix.com/support/technical/datasheets/mogarrays_ddatasheet.pdf
- Affymetrix (2004): Statistical Algorithms Reference Guide, http://www.affymetrix.com/support/technical/technotes/statistical_reference_guide.pdf
- Al-Taie, O. H.; Seufert, J.; Mork, H.; Treis, H.; Mentrup, B.; Thalheimer, A.; Starostik, P.; Abel, J.; Scheurlen, M.; Kohrle, J. and Jakob, F. (2002): A complex DNA-repeat structure within the Selenoprotein P promoter contains a functionally relevant polymorphism and is genetically unstable under conditions of mismatch repair deficiency, *Eur J Hum Genet* (vol. 10), No. 9, pp. 499-504. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12173025
- Al-Taie, O. H.; Uceyler, N.; Eubner, U.; Jakob, F.; Mork, H.; Scheurlen, M.; Brigelius-Flohe, R.; Schottker, K.; Abel, J.; Thalheimer, A.; Katzenberger, T.; Illert, B.; Melcher, R. and Kohrle, J. (2004): Expression profiling and genetic alterations of the selenoproteins GI-GPx and SePP in colorectal carcinogenesis, *Nutr Cancer* (vol. 48), No. 1, pp. 6-14. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15203372
- Alberts, R.; Terpstra, P.; Hardonk, M.; Bystrykh, L. V.; de Haan, G.; Breitling, R.; Nap, J. P. and Jansen, R. C. (2007): A verification protocol for the probe sequences of Affymetrix genome arrays reveals high probe accuracy for studies in mouse, human and rat, *BMC Bioinformatics* (vol. 8), p. 132. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17448222
- Arner, E. S. and Holmgren, A. (2006): The thioredoxin system in cancer, *Semin Cancer Biol* (vol. 16), No. 6, pp. 420-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17092741
- Arteel, G. E.; Mostert, V.; Oubrahim, H.; Briviba, K.; Abel, J. and Sies, H. (1998): Protection by selenoprotein P in human plasma against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration, *Biol Chem* (vol. 379), No. 8-9, pp. 1201-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9792455
- Atreya, R. and Neurath, M. F. (2005): Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer, *Clin Rev Allergy Immunol* (vol. 28), No. 3, pp. 187-96. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16129903
- Axley, M. J.; Bock, A. and Stadtman, T. C. (1991): Catalytic properties of an Escherichia coli formate dehydrogenase mutant in which sulfur replaces selenium, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 88), No. 19, pp. 8450-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1924303
- Banning, A.; Deubel, S.; Kluth, D.; Zhou, Z. and Brigelius-Flohe, R. (2005): The GI-GPx gene is a target for Nrf2, *Mol Cell Biol* (vol. 25), No. 12, pp. 4914-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15923610

- Bansal, M. P.; Cook, R. G.; Danielson, K. G. and Medina, D. (1989): A 14-kilodalton selenium-binding protein in mouse liver is fatty acid-binding protein, *J Biol Chem* (vol. 264), No. 23, pp. 13780-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2760043
- Bansal, M. P.; Mukhopadhyay, T.; Scott, J.; Cook, R. G.; Mukhopadhyay, R. and Medina, D. (1990): DNA sequencing of a mouse liver protein that binds selenium: implications for selenium's mechanism of action in cancer prevention, *Carcinogenesis* (vol. 11), No. 11, pp. 2071-3. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2225343
- Barker, N. and Clevers, H. (2006): Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics, *Nat Rev Drug Discov* (vol. 5), No. 12, pp. 997-1014. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17139285
- Beerenwinkel, N.; Antal, T.; Dingli, D.; Traulsen, A.; Kinzler, K. W.; Velculescu, V. E.; Vogelstein, B. and Nowak, M. A. (2007): Genetic progression and the waiting time to cancer, *PLoS Comput Biol* (vol. 3), No. 11, p. e225. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17997597
- Behrens, J. (2000): Control of beta-catenin signaling in tumor development, *Ann N Y Acad Sci* (vol. 910), pp. 21-33; discussion 33-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10911903
- Berger, M. M. and Shenkin, A. (2007): Selenium in intensive care: probably not a magic bullet but an important adjuvant therapy, *Crit Care Med* (vol. 35), No. 1, pp. 306-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17197777
- Bermano, G.; Nicol, F.; Dyer, J. A.; Sunde, R. A.; Beckett, G. J.; Arthur, J. R. and Hesketh, J. E. (1995): Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats, *Biochem J* (vol. 311 (Pt 2)), pp. 425-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7487877
- Berry, M. J.; Maia, A. L.; Kieffer, J. D.; Harney, J. W. and Larsen, P. R. (1992): Substitution of cysteine for selenocysteine in type I iodothyronine deiodinase reduces the catalytic efficiency of the protein but enhances its translation, *Endocrinology* (vol. 131), No. 4, pp. 1848-52. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1396330
- Bianco, A. C. and Kim, B. W. (2006): Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action, *J Clin Invest* (vol. 116), No. 10, pp. 2571-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17016550
- Biroccio, A.; Benassi, B.; D'Agnano, I.; D'Angelo, C.; Buglioni, S.; Mottolise, M.; Ricciotti, A.; Citro, G.; Cosimelli, M.; Ramsay, R. G.; Calabretta, B. and Zupi, G. (2001): c-Myb and Bcl-x overexpression predicts poor prognosis in colorectal cancer: clinical and experimental findings, *Am J Pathol* (vol. 158), No. 4, pp. 1289-99. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11290547
- Bjelakovic, G.; Nagorni, A.; Nikolova, D.; Simonetti, R. G.; Bjelakovic, M. and Gluud, C. (2006): Meta-analysis: antioxidant supplements for primary and secondary prevention of colorectal adenoma, *Aliment Pharmacol Ther* (vol. 24), No. 2, pp. 281-91. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16842454
- Bjelakovic, G.; Nikolova, D.; Simonetti, R. G. and Gluud, C. (2004): Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis, *Lancet* (vol. 364), No. 9441, pp. 1219-28. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15464182

- Bock, A.; Forchhammer, K.; Heider, J.; Leinfelder, W.; Sawers, G.; Veprek, B. and Zinoni, F. (1991): Selenocysteine: the 21st amino acid, *Mol Microbiol* (vol. 5), No. 3, pp. 515-20. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1828528
- Bondareva, A. A.; Capecchi, M. R.; Iverson, S. V.; Li, Y.; Lopez, N. I.; Lucas, O.; Merrill, G. F.; Prigge, J. R.; Siders, A. M.; Wakamiya, M.; Wallin, S. L. and Schmidt, E. E. (2007): Effects of thioredoxin reductase-1 deletion on embryogenesis and transcriptome, *Free Radic Biol Med* (vol. 43), No. 6, pp. 911-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17697936
- Bondi, J.; Husdal, A.; Bukholm, G.; Nesland, J. M.; Bakka, A. and Bukholm, I. R. (2005): Expression and gene amplification of primary (A, B1, D1, D3, and E) and secondary (C and H) cyclins in colon adenocarcinomas and correlation with patient outcome, *J Clin Pathol* (vol. 58), No. 5, pp. 509-14. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15858123
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* (vol. 72), pp. 248-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=942051
- Brigelius-Flohe, R. (1999): Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases, *Free Radic Biol Med* (vol. 27), No. 9-10, pp. 951-65. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10569628
- Brigelius-Flohe, R. (2006): Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors, *Biol Chem* (vol. 387), No. 10-11, pp. 1329-35. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17081103
- Brozek, W.; Bises, G.; Girsch, T.; Cross, H. S.; Kaiser, H. E. and Peterlik, M. (2005): Differentiation-dependent expression and mitogenic action of interleukin-6 in human colon carcinoma cells: relevance for tumour progression, *Eur J Cancer* (vol. 41), No. 15, pp. 2347-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16176872
- Burk, R. F. and Hill, K. E. (2005): Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis, *Annu Rev Nutr* (vol. 25), pp. 215-35. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16011466
- Burk, R. F.; Hill, K. E. and Motley, A. K. (2001): Plasma selenium in specific and non-specific forms, *Biofactors* (vol. 14), No. 1-4, pp. 107-14. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11568447
- Burk, R. F.; Norsworthy, B. K.; Hill, K. E.; Motley, A. K. and Byrne, D. W. (2006): Effects of chemical form of selenium on plasma biomarkers in a high-dose human supplementation trial, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (vol. 15), No. 4, pp. 804-10. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16614127
- Cadioux, B.; Ching, T. T.; VandenBerg, S. R. and Costello, J. F. (2006): Genome-wide hypomethylation in human glioblastomas associated with specific copy number alteration, methylenetetrahydrofolate reductase allele status, and increased proliferation, *Cancer Res* (vol. 66), No. 17, pp. 8469-76. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16951158
- Castellone, M. D.; Teramoto, H.; Williams, B. O.; Druey, K. M. and Gutkind, J. S. (2005): Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis, *Science* (vol. 310), No. 5753, pp. 1504-10. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16293724
- Chakrabarty, S. (1992): Regulation of human colon-carcinoma cell adhesion to extracellular matrix by transforming growth factor beta 1, *Int J Cancer* (vol. 50), No. 6, pp. 968-73. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1555895
- Chang, P. W.; Tsui, S. K.; Liew, C.; Lee, C. C.; Waye, M. M. and Fung, K. P. (1997): Isolation, characterization, and chromosomal mapping of a novel cDNA clone encoding human selenium binding protein, *J Cell Biochem* (vol. 64), No. 2, pp. 217-24. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9027582
- Chavatte, L.; Brown, B. A. and Driscoll, D. M. (2005): Ribosomal protein **L30** is a component of the UGA-selenocysteine recoding machinery in eukaryotes, *Nat Struct Mol Biol* (vol. 12), No. 5, pp. 408-16. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15821744
- Cherian, M. G.; Jayasurya, A. and Bay, B. H. (2003): Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis, *Mutat Res* (vol. 533), No. 1-2, pp. 201-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14643421
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal Biochem* (vol. 162), No. 1, pp. 156-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2440339
- Chu, F. F.; Esworthy, R. S.; Chu, P. G.; Longmate, J. A.; Huycke, M. M.; Wilczynski, S. and Doroshov, J. H. (2004): Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted Gpx1 and Gpx2 genes, *Cancer Res* (vol. 64), No. 3, pp. 962-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14871826
- Chu, F. F.; Esworthy, R. S. and Doroshov, J. H. (2004): Role of Se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer, *Free Radic Biol Med* (vol. 36), No. 12, pp. 1481-95. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15182851
- Clark, L. C.; Combs, G. F., Jr.; Turnbull, B. W.; Slate, E. H.; Chalker, D. K.; Chow, J.; Davis, L. S.; Glover, R. A.; Graham, G. F.; Gross, E. G.; Krongrad, A.; Leshner, J. L., Jr.; Park, H. K.; Sanders, B. B., Jr.; Smith, C. L. and Taylor, J. R. (1996): Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group, *Jama* (vol. 276), No. 24, pp. 1957-63. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8971064
- Clarke, A. R. (2007): Cancer genetics: mouse models of intestinal cancer, *Biochem Soc Trans* (vol. 35), No. Pt 5, pp. 1338-41. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17956346
- Combs, G. F., Jr. (2001): Impact of selenium and cancer-prevention findings on the nutrition-health paradigm, *Nutr Cancer* (vol. 40), No. 1, pp. 6-11. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11799925
- Combs, G. F., Jr. and Gray, W. P. (1998): Chemopreventive agents: selenium, *Pharmacol Ther* (vol. 79), No. 3, pp. 179-92. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9776375
- Conrad, M.; Jakupoglu, C.; Moreno, S. G.; Lippl, S.; Banjac, A.; Schneider, M.; Beck, H.; Hatzopoulos, A. K.; Just, U.; Sinowatz, F.; Schmahl, W.; Chien, K. R.; Wurst, W.; Bornkamm, G. W. and Brielmeier, M. (2004): Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function, *Mol Cell Biol* (vol. 24), No. 21, pp. 9414-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15485910
- Cramer, T.; Yamanishi, Y.; Clausen, B. E.; Forster, I.; Pawlinski, R.; Mackman, N.; Haase, V. H.; Jaenisch, R.; Corr, M.; Nizet, V.; Firestein, G. S.; Gerber, H. P.; Ferrara, N. and Johnson, R. S. (2003): HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation, *Cell* (vol. 112), No. 5, pp. 645-57. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12628185
- Davies, M.; Gupta, S.; Goldspink, G. and Winslet, M. (2006): The insulin-like growth factor system and colorectal cancer: clinical and experimental evidence, *Int J Colorectal Dis* (vol. 21), No. 3, pp. 201-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15959790
- de Lau, W.; Barker, N. and Clevers, H. (2007): WNT signaling in the normal intestine and colorectal cancer, *Front Biosci* (vol. 12), pp. 471-91. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17127311
- Dinkova-Kostova, A. T.; Holtzclaw, W. D.; Cole, R. N.; Itoh, K.; Wakabayashi, N.; Katoh, Y.; Yamamoto, M. and Talalay, P. (2002): Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 99), No. 18, pp. 11908-13. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12193649
- Diwadkar-Navsariwala, V. and Diamond, A. M. (2004): The link between selenium and chemoprevention: a case for selenoproteins, *J Nutr* (vol. 134), No. 11, pp. 2899-902. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15514248
- Diwadkar-Navsariwala, V.; Prins, G. S.; Swanson, S. M.; Birch, L. A.; Ray, V. H.; Hedayat, S.; Lantvit, D. L. and Diamond, A. M. (2006): Selenoprotein deficiency accelerates prostate carcinogenesis in a transgenic model, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 103), No. 21, pp. 8179-84. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16690748
- Dreher, I.; Jakobs, T. C. and Kohrle, J. (1997): Cloning and characterization of the human selenoprotein P promoter. Response of selenoprotein P expression to cytokines in liver cells, *J Biol Chem* (vol. 272), No. 46, pp. 29364-71. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9361018
- Droge, W. (2002): Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiol Rev* (vol. 82), No. 1, pp. 47-95. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11773609
- Duffield-Lillico, A. J.; Reid, M. E.; Turnbull, B. W.; Combs, G. F., Jr.; Slate, E. H.; Fischbach, L. A.; Marshall, J. R. and Clark, L. C. (2002): Baseline characteristics and the effect of selenium supplementation on cancer incidence in a randomized clinical trial: a summary report of the Nutritional Prevention of Cancer Trial, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (vol. 11), No. 7, pp. 630-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12101110
- Dumitrescu, A. M.; Liao, X. H.; Abdullah, M. S.; Lado-Abeal, J.; Majed, F. A.; Moeller, L. C.; Boran, G.; Schomburg, L.; Weiss, R. E. and Refetoff, S. (2005): Mutations in SECISBP2 result in abnormal thyroid hormone metabolism, *Nat Genet* (vol. 37), No. 11, pp. 1247-52. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16228000
- Durai, R.; Yang, W.; Gupta, S.; Seifalian, A. M. and Winslet, M. C. (2005): The role of the insulin-like growth factor system in colorectal cancer: review of current knowledge, *Int J Colorectal Dis* (vol. 20), No. 3, pp. 203-20. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15650828
- Eisinger, A. L.; Prescott, S. M.; Jones, D. A. and Stafforini, D. M. (2007): The role of cyclooxygenase-2 and prostaglandins in colon cancer, *Prostaglandins Other Lipid Mediat* (vol. 82), No. 1-4, pp. 147-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17164142
- Esworthy, R. S.; Aranda, R.; Martin, M. G.; Doroshov, J. H.; Binder, S. W. and Chu, F. F. (2001): Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (vol. 281), No. 3, pp. G848-55. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11518697
- Esworthy, R. S.; Mann, J. R.; Sam, M. and Chu, F. F. (2000): Low glutathione peroxidase activity in Gpx1 knock-out mice protects jejunum crypts from gamma-irradiation damage, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (vol. 279), No. 2, pp. G426-36. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10915653
- Esworthy, R. S.; Yang, L.; Frankel, P. H. and Chu, F. F. (2005): Epithelium-specific glutathione peroxidase, Gpx2, is involved in the prevention of intestinal inflammation in selenium-deficient mice, *J Nutr* (vol. 135), No. 4, pp. 740-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15795427
- Etminan, M.; FitzGerald, J. M.; Gleave, M. and Chambers, K. (2005): Intake of selenium in the prevention of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis, *Cancer Causes Control* (vol. 16), No. 9, pp. 1125-31. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16184479
- Etoh, T.; Shibuta, K.; Barnard, G. F.; Kitano, S. and Mori, M. (2000): Angiogenin expression in human colorectal cancer: the role of focal macrophage infiltration, *Clin Cancer Res* (vol. 6), No. 9, pp. 3545-51. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10999742
- Feinberg, A. P. (2007): Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease, *Nature* (vol. 447), No. 7143, pp. 433-40. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17522677
- Ficari, F.; Cama, A.; Valanzano, R.; Curia, M. C.; Palmirotta, R.; Aceto, G.; Esposito, D. L.; Crognale, S.; Lombardi, A.; Messerini, L.; Mariani-Costantini, R.; Tonelli, F. and Battista, P. (2000): APC gene mutations and colorectal adenomatosis in familial adenomatous polyposis, *Br J Cancer* (vol. 82), No. 2, pp. 348-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10646887
- Flohe, L. and Gunzler, W. A. (1984): Assays of glutathione peroxidase, *Methods Enzymol* (vol. 105), pp. 114-21. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6727659
- Flohe, L.; Gunzler, W. A. and Schock, H. H. (1973): Glutathione peroxidase: a selenoenzyme, *FEBS Lett* (vol. 32), No. 1, pp. 132-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4736708
- Florian, S.; Wingler, K.; Schmehl, K.; Jacobasch, G.; Kreuzer, O. J.; Meyerhof, W. and Brigelius-Flohe, R. (2001): Cellular and subcellular localization of gastrointestinal glutathione peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue, *Free Radic Res* (vol. 35), No. 6, pp. 655-63. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11811519
- Fodde, R.; Smits, R.; Hofland, N.; Kielman, M. and Meera Khan, P. (1999): Mechanisms of APC-driven tumorigenesis: lessons from mouse models, *Cytogenet Cell Genet* (vol. 86), No. 2, pp. 105-11. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10545699
- Foulstone, E.; Prince, S.; Zaccheo, O.; Burns, J. L.; Harper, J.; Jacobs, C.; Church, D. and Hassan, A. B. (2005): Insulin-like growth factor ligands, receptors, and binding proteins in cancer, *J Pathol* (vol. 205), No. 2, pp. 145-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15641016
- Friedrich, A. and Kullmann, F. (2003): [Familial adenomatous polyposis syndrome (FAP): pathogenesis and molecular mechanisms], *Med Klin (Munich)* (vol. 98), No. 12, pp. 776-82. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14685680

- Galiatsatos, P. and Foulkes, W. D. (2006): Familial adenomatous polyposis, *Am J Gastroenterol* (vol. 101), No. 2, pp. 385-98. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16454848
- Gardiner-Garden, M. and Frommer, M. (1987): CpG islands in vertebrate genomes, *J Mol Biol* (vol. 196), No. 2, pp. 261-82. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3656447
- Gasdaska, J. R.; Harney, J. W.; Gasdaska, P. Y.; Powis, G. and Berry, M. J. (1999): Regulation of human thioredoxin reductase expression and activity by 3'-untranslated region selenocysteine insertion sequence and mRNA instability elements, *J Biol Chem* (vol. 274), No. 36, pp. 25379-85. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10464265
- Gaudet, F.; Hodgson, J. G.; Eden, A.; Jackson-Grusby, L.; Dausman, J.; Gray, J. W.; Leonhardt, H. and Jaenisch, R. (2003): Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation, *Science* (vol. 300), No. 5618, pp. 489-92. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12702876
- Gavert, N.; Conacci-Sorrell, M.; Gast, D.; Schneider, A.; Altevogt, P.; Brabletz, T. and Ben-Ze'ev, A. (2005): L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers, *J Cell Biol* (vol. 168), No. 4, pp. 633-42. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15716380
- Gladyshev, V. N.; Factor, V. M.; Housseau, F. and Hatfield, D. L. (1998): Contrasting patterns of regulation of the antioxidant selenoproteins, thioredoxin reductase, and glutathione peroxidase, in cancer cells, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 251), No. 2, pp. 488-93. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9792801
- Gregorieff, A. and Clevers, H. (2005): Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer, *Genes Dev* (vol. 19), No. 8, pp. 877-90. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15833914
- Gromer, S.; Eubel, J. K.; Lee, B. L. and Jacob, J. (2005): Human selenoproteins at a glance, *Cell Mol Life Sci* (vol. 62), No. 21, pp. 2414-37. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16231092
- Gutfeld, O.; Prus, D.; Ackerman, Z.; Dishon, S.; Linke, R. P.; Levin, M. and Urieli-Shoval, S. (2006): Expression of serum amyloid A, in normal, dysplastic, and neoplastic human colonic mucosa: implication for a role in colonic tumorigenesis, *J Histochem Cytochem* (vol. 54), No. 1, pp. 63-73. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16116035
- Haq, F.; Mahoney, M. and Koropatnick, J. (2003): Signaling events for metallothionein induction, *Mutat Res* (vol. 533), No. 1-2, pp. 211-26. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14643422
- Heikkinen, S.; Auwerx, J. and Argmann, C. A. (2007): PPARgamma in human and mouse physiology, *Biochim Biophys Acta* (vol. 1771), No. 8, pp. 999-1013. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17475546
- Hill, K. E.; McCollum, G. W.; Boeglin, M. E. and Burk, R. F. (1997): Thioredoxin reductase activity is decreased by selenium deficiency, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 234), No. 2, pp. 293-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9177261
- Hill, K. E.; Zhou, J.; McMahan, W. J.; Motley, A. K.; Atkins, J. F.; Gesteland, R. F. and Burk, R. F. (2003): Deletion of selenoprotein P alters distribution of selenium in the mouse, *J Biol Chem* (vol. 278), No. 16, pp. 13640-6. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12574155
- Hughes, M. F. (2002): Arsenic toxicity and potential mechanisms of action, *Toxicol Lett* (vol. 133), No. 1, pp. 1-16. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12076506
- Hussain, S. P.; Hofseth, L. J. and Harris, C. C. (2003): Radical causes of cancer, *Nat Rev Cancer* (vol. 3), No. 4, pp. 276-85. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12671666
- Inoue, K.; Mallakin, A. and Frazier, D. P. (2007): Dmp1 and tumor suppression, *Oncogene* (vol. 26), No. 30, pp. 4329-35. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17237816
- Ip, C.; Dong, Y. and Ganther, H. E. (2002): New concepts in selenium chemoprevention, *Cancer Metastasis Rev* (vol. 21), No. 3-4, pp. 281-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12549766
- Irons, R.; Carlson, B. A.; Hatfield, D. L. and Davis, C. D. (2006): Both selenoproteins and low molecular weight selenocompounds reduce colon cancer risk in mice with genetically impaired selenoprotein expression, *J Nutr* (vol. 136), No. 5, pp. 1311-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16614422
- Itzkowitz, S. H. and Yio, X. (2004): Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (vol. 287), No. 1, pp. G7-17. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15194558
- Jacobs, E. T.; Jiang, R.; Alberts, D. S.; Greenberg, E. R.; Gunter, E. W.; Karagas, M. R.; Lanza, E.; Ratnasinghe, L.; Reid, M. E.; Schatzkin, A.; Smith-Warner, S. A.; Wallace, K. and Martinez, M. E. (2004): Selenium and colorectal adenoma: results of a pooled analysis, *J Natl Cancer Inst* (vol. 96), No. 22, pp. 1669-75. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15547179
- Jakupoglu, C.; Przemeck, G. K.; Schneider, M.; Moreno, S. G.; Mayr, N.; Hatzopoulos, A. K.; de Angelis, M. H.; Wurst, W.; Bornkamm, G. W.; Brielmeier, M. and Conrad, M. (2005): Cytoplasmic thioredoxin reductase is essential for embryogenesis but dispensable for cardiac development, *Mol Cell Biol* (vol. 25), No. 5, pp. 1980-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15713651
- Jerome, L.; Shiry, L. and Leyland-Jones, B. (2003): Deregulation of the IGF axis in cancer: epidemiological evidence and potential therapeutic interventions, *Endocr Relat Cancer* (vol. 10), No. 4, pp. 561-78. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14713267
- Johnson, V.; Lipton, L. R.; Cummings, C.; Eftekhari Sadat, A. T.; Izatt, L.; Hodgson, S. V.; Talbot, I. C.; Thomas, H. J.; Silver, A. J. and Tomlinson, I. P. (2005): Analysis of somatic molecular changes, clinicopathological features, family history, and germline mutations in colorectal cancer families: evidence for efficient diagnosis of HNPCC and for the existence of distinct groups of non-HNPCC families, *J Med Genet* (vol. 42), No. 10, pp. 756-62. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15788729
- Jones, P. A. and Baylin, S. B. (2002): The fundamental role of epigenetic events in cancer, *Nat Rev Genet* (vol. 3), No. 6, pp. 415-28. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12042769
- Jones, P. A. and Baylin, S. B. (2007): The epigenomics of cancer, *Cell* (vol. 128), No. 4, pp. 683-92. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17320506

- Kelly, K. A. and Jones, D. A. (2003): Isolation of a colon tumor specific binding peptide using phage display selection, *Neoplasia* (vol. 5), No. 5, pp. 437-44. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14670181
- Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1998): Landscaping the cancer terrain, *Science* (vol. 280), No. 5366, pp. 1036-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9616081
- Kipp, A.; Banning, A. and Brigelius-Flohe, R. (2007): Activation of the glutathione peroxidase 2 (GPx2) promoter by beta-catenin, *Biol Chem* (vol. 388), No. 10, pp. 1027-33. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17937616
- Klein, E. A.; Thompson, I. M.; Lippman, S. M.; Goodman, P. J.; Albanes, D.; Taylor, P. R. and Coltman, C. (2000): SELECT: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial: rationale and design, *Prostate Cancer Prostatic Dis* (vol. 3), No. 3, pp. 145-151. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12497090
- Kohrl, J.; Brigelius-Flohe, R.; Bock, A.; Gartner, R.; Meyer, O. and Flohe, L. (2000): Selenium in biology: facts and medical perspectives, *Biol Chem* (vol. 381), No. 9-10, pp. 849-64. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11076017
- Kohrle, J. (2000): The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action, *Cell Mol Life Sci* (vol. 57), No. 13-14, pp. 1853-63. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11215512
- Krol, A. (2002): Evolutionarily different RNA motifs and RNA-protein complexes to achieve selenoprotein synthesis, *Biochimie* (vol. 84), No. 8, pp. 765-74. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12457564
- Kryukov, G. V.; Castellano, S.; Novoselov, S. V.; Lobanov, A. V.; Zehtab, O.; Guigo, R. and Gladyshev, V. N. (2003): Characterization of mammalian selenoproteomes, *Science* (vol. 300), No. 5624, pp. 1439-43. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12775843
- Kuiper, G. G.; Klootwijk, W. and Visser, T. J. (2003): Substitution of cysteine for selenocysteine in the catalytic center of type III iodothyronine deiodinase reduces catalytic efficiency and alters substrate preference, *Endocrinology* (vol. 144), No. 6, pp. 2505-13. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12746313
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* (vol. 227), No. 5259, pp. 680-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5432063
- Lanfear, J.; Fleming, J.; Walker, M. and Harrison, P. (1993): Different patterns of regulation of the genes encoding the closely related 56 kDa selenium- and acetaminophen-binding proteins in normal tissues and during carcinogenesis, *Carcinogenesis* (vol. 14), No. 3, pp. 335-40. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8453708
- Lazar, D.; Raica, M.; Sporea, I.; Taban, S.; Goldis, A. and Cornianu, M. (2006): Tumor angiogenesis in gastric cancer, *Rom J Morphol Embryol* (vol. 47), No. 1, pp. 5-13. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16838051
- Lee, S. R.; Bar-Noy, S.; Kwon, J.; Levine, R. L.; Stadtman, T. C. and Rhee, S. G. (2000): Mammalian thioredoxin reductase: oxidation of the C-terminal cysteine/selenocysteine active site forms a thioselenide, and replacement of selenium with sulfur markedly reduces catalytic activity, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 97), No. 6, pp. 2521-6. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10688911
- Leslie, M. (2007): Mast cells show their might, *Science* (vol. 317), No. 5838, pp. 614-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17673649
- Levy, D. B.; Smith, K. J.; Beazer-Barclay, Y.; Hamilton, S. R.; Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (1994): Inactivation of both APC alleles in human and mouse tumors, *Cancer Res* (vol. 54), No. 22, pp. 5953-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7954428
- Li, L.; Huang, Y. H.; Li, Y.; Wang, F. Q.; Shang, B. Y. and Zhen, Y. S. (2005): Antitumor activity of anti-type IV collagenase monoclonal antibody and its lidamycin conjugate against colon carcinoma, *World J Gastroenterol* (vol. 11), No. 29, pp. 4478-83. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16052675
- Luo, Q.; Kang, Q.; Si, W.; Jiang, W.; Park, J. K.; Peng, Y.; Li, X.; Luu, H. H.; Luo, J.; Montag, A. G.; Haydon, R. C. and He, T. C. (2004): Connective tissue growth factor (CTGF) is regulated by Wnt and bone morphogenetic proteins signaling in osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells, *J Biol Chem* (vol. 279), No. 53, pp. 55958-68. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15496414
- Luongo, C.; Gould, K. A.; Su, L. K.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B.; Dietrich, W.; Lander, E. S. and Moser, A. R. (1993): Mapping of multiple intestinal neoplasia (Min) to proximal chromosome 18 of the mouse, *Genomics* (vol. 15), No. 1, pp. 3-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8094372
- McClintick, J. N. and Edenberg, H. J. (2006): Effects of filtering by Present call on analysis of microarray experiments, *BMC Bioinformatics* (vol. 7), p. 49. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16448562
- Meplan, C.; Crosley, L. K.; Nicol, F.; Beckett, G. J.; Howie, A. F.; Hill, K. E.; Horgan, G.; Mathers, J. C.; Arthur, J. R. and Hesketh, J. E. (2007): Genetic polymorphisms in the human selenoprotein P gene determine the response of selenoprotein markers to selenium supplementation in a gender-specific manner (the SELGEN study), *FASEB J* (vol. 21), No. 12, pp. 3063-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17536041
- Miller, H. R. and Pemberton, A. D. (2002): Tissue-specific expression of mast cell granule serine proteinases and their role in inflammation in the lung and gut, *Immunology* (vol. 105), No. 4, pp. 375-90. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11985658
- Mizoue, T.; Tanaka, K.; Tsuji, I.; Wakai, K.; Nagata, C.; Otani, T.; Inoue, M. and Tsugane, S. (2006): Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an evaluation based on a systematic review of epidemiologic evidence among the Japanese population, *Jpn J Clin Oncol* (vol. 36), No. 9, pp. 582-97. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16870695
- Moriarty, P. M.; Reddy, C. C. and Maquat, L. E. (1998): Selenium deficiency reduces the abundance of mRNA for Se-dependent glutathione peroxidase 1 by a UGA-dependent mechanism likely to be nonsense codon-mediated decay of cytoplasmic mRNA, *Mol Cell Biol* (vol. 18), No. 5, pp. 2932-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9566912
- Morin, P. J.; Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (1996): Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 93), No. 15, pp. 7950-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8755583
- Mork, H.; al-Taie, O. H.; Bahr, K.; Zierer, A.; Beck, C.; Scheurlen, M.; Jakob, F. and Kohrle, J. (2000): Inverse mRNA expression of the selenocysteine-containing proteins GI-GPx and SeP in colorectal adenomas compared with adjacent normal mucosa, *Nutr Cancer* (vol. 37), No. 1, pp. 108-16. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10965527
- Moser, A. R.; Luongo, C.; Gould, K. A.; McNeley, M. K.; Shoemaker, A. R. and Dove, W. F. (1995): ApcMin: a mouse model for intestinal and mammary tumorigenesis, *Eur J Cancer* (vol. 31A), No. 7-8, pp. 1061-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7576992
- Moser, A. R.; Pitot, H. C. and Dove, W. F. (1990): A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse, *Science* (vol. 247), No. 4940, pp. 322-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2296722
- Mostert, V.; Dreher, I.; Kohrle, J. and Abel, J. (1999): Transforming growth factor-beta1 inhibits expression of selenoprotein P in cultured human liver cells, *FEBS Lett* (vol. 460), No. 1, pp. 23-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10571054
- Mostert, V.; Dreher, I.; Kohrle, J.; Wolff, S. and Abel, J. (2001): Modulation of selenoprotein P expression by TGF-beta(1) is mediated by Smad proteins, *Biofactors* (vol. 14), No. 1-4, pp. 135-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11568450
- Muncan, V.; Sansom, O. J.; Tertoolen, L.; Phesse, T. J.; Begthel, H.; Sancho, E.; Cole, A. M.; Gregorieff, A.; de Alboran, I. M.; Clevers, H. and Clarke, A. R. (2006): Rapid loss of intestinal crypts upon conditional deletion of the Wnt/Tcf-4 target gene c-Myc, *Mol Cell Biol* (vol. 26), No. 22, pp. 8418-26. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16954380
- Nakayama, T.; Morishita, T. and Kamiya, T. (2002): Adenomatous polyposis coli gene as a gatekeeper, *Rev Gastroenterol Peru* (vol. 22), No. 2, pp. 164-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12098745
- Nezu, M.; Tomonaga, T.; Sakai, C.; Ishii, A.; Itoga, S.; Nishimura, M.; Matsuo, Y.; Tagawa, M. and Nomura, F. (2005): Expression of the fetal-oncogenic fibroblast growth factor-8/17/18 subfamily in human hematopoietic tumors, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 335), No. 3, pp. 843-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16095560
- Nordberg, J. and Arner, E. S. (2001): Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system, *Free Radic Biol Med* (vol. 31), No. 11, pp. 1287-312. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11728801
- Norkina, O.; Kaur, S.; Ziemer, D. and De Lisle, R. C. (2004): Inflammation of the cystic fibrosis mouse small intestine, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (vol. 286), No. 6, pp. G1032-41. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14739145
- Nowak, M. A.; Komarova, N. L.; Sengupta, A.; Jallepalli, P. V.; Shih Ie, M.; Vogelstein, B. and Lengauer, C. (2002): The role of chromosomal instability in tumor initiation, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 99), No. 25, pp. 16226-31. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12446840
- Oshima, M.; Oshima, H.; Kitagawa, K.; Kobayashi, M.; Itakura, C. and Taketo, M. (1995): Loss of Apc heterozygosity and abnormal tissue building in nascent intestinal polyps in mice carrying a truncated Apc gene, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 92), No. 10, pp. 4482-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7753829
- Paoni, N. F.; Feldman, M. W.; Gutierrez, L. S.; Ploplis, V. A. and Castellino, F. J. (2003): Transcriptional profiling of the transition from normal intestinal epithelia to adenomas and carcinomas in the APCMin/+ mouse, *Physiol Genomics* (vol. 15), No. 3, pp. 228-35. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13130079

- Papp, L. V.; Lu, J.; Holmgren, A. and Khanna, K. K. (2007): From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health, *Antioxid Redox Signal* (vol. 9), No. 7, pp. 775-806. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17508906
- Park, H. L.; Kim, M. S.; Yamashita, K.; Westra, W.; Carvalho, A. L.; Lee, J.; Jiang, W. W.; Baek, J. H.; Liu, J.; Osada, M.; Moon, C. S.; Califano, J. A.; Mori, M. and Sidransky, D. (2008): DCC promoter hypermethylation in esophageal squamous cell carcinoma, *Int J Cancer* (vol. 122), No. 11, pp. 2498-502. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18302152
- Pervaiz, S. and Clement, M. V. (2007): Superoxide anion: oncogenic reactive oxygen species?, *Int J Biochem Cell Biol* (vol. 39), No. 7-8, pp. 1297-304. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17531522
- Perwez Hussain, S. and Harris, C. C. (2007): Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials, *Int J Cancer* (vol. 121), No. 11, pp. 2373-80. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17893866
- Pfaffl, M. W.; Horgan, G. W. and Dempfle, L. (2002): Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR, *Nucleic Acids Res* (vol. 30), No. 9, p. e36. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11972351
- Pinto, D. and Clevers, H. (2005): Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium, *Exp Cell Res* (vol. 306), No. 2, pp. 357-63. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15925592
- Powis, G. and Montfort, W. R. (2001): Properties and biological activities of thioredoxins, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* (vol. 30), pp. 421-55. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11441809
- Rajagopalan, H.; Nowak, M. A.; Vogelstein, B. and Lengauer, C. (2003): The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer, *Nat Rev Cancer* (vol. 3), No. 9, pp. 695-701. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12951588
- Ramsay, R. G.; Ciznadija, D.; Sicurella, C.; Reyes, N.; Mitchelhill, K.; Darcy, P. K.; D'Abaco, G. and Mantamadiotis, T. (2005): Colon epithelial cell differentiation is inhibited by constitutive c-myc expression or mutant APC plus activated RAS, *DNA Cell Biol* (vol. 24), No. 1, pp. 21-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15684716
- Rayman, M. P. (2005): Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action, *Proc Nutr Soc* (vol. 64), No. 4, pp. 527-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16313696
- Rayman, M. P. and Rayman, M. P. (2002): The argument for increasing selenium intake, *Proc Nutr Soc* (vol. 61), No. 2, pp. 203-15. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12133202
- Renko, K.; Werner, M.; Renner-Muller, I.; Cooper, T. G.; Yeung, C. H.; Hollenbach, B.; Scharpf, M.; Kohrle, J.; Schomburg, L. and Schweizer, U. (2008): Hepatic selenoprotein P (SePP) expression restores selenium transport and prevents infertility and motor-incoordination in Sepp-knockout mice, *Biochem J* (vol. 409), No. 3, pp. 741-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17961124
- Reya, T. and Clevers, H. (2005): Wnt signalling in stem cells and cancer, *Nature* (vol. 434), No. 7035, pp. 843-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15829953

- Riese, C.; Michaelis, M.; Mentrup, B.; Gotz, F.; Kohrle, J.; Schweizer, U. and Schomburg, L. (2006): Selenium-dependent pre- and posttranscriptional mechanisms are responsible for sexual dimorphic expression of selenoproteins in murine tissues, *Endocrinology* (vol. 147), No. 12, pp. 5883-92. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16959840
- Rundlof, A. K. and Arner, E. S. (2004): Regulation of the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase 1 in relation to cellular phenotype, growth, and signaling events, *Antioxid Redox Signal* (vol. 6), No. 1, pp. 41-52. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14980055
- Rustgi, A. K. (2007): The genetics of hereditary colon cancer, *Genes Dev* (vol. 21), No. 20, pp. 2525-38. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17938238
- Sachdev, D.; Hartell, J. S.; Lee, A. V.; Zhang, X. and Yee, D. (2004): A dominant negative type I insulin-like growth factor receptor inhibits metastasis of human cancer cells, *J Biol Chem* (vol. 279), No. 6, pp. 5017-24. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14615489
- Santoro, I. M. and Groden, J. (1997): Alternative splicing of the APC gene and its association with terminal differentiation, *Cancer Res* (vol. 57), No. 3, pp. 488-94. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9012479
- Schneider, M. J.; Fiering, S. N.; Thai, B.; Wu, S. Y.; St Germain, E.; Parlow, A. F.; St Germain, D. L. and Galton, V. A. (2006): Targeted disruption of the type 1 selenodeiodinase gene (Dio1) results in marked changes in thyroid hormone economy in mice, *Endocrinology* (vol. 147), No. 1, pp. 580-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16223863
- Schomburg, L.; Schweizer, U.; Holtmann, B.; Flohe, L.; Sendtner, M. and Kohrle, J. (2003): Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues, *Biochem J* (vol. 370), No. Pt 2, pp. 397-402. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12521380
- Schomburg, L.; Schweizer, U. and Kohrle, J. (2004): Selenium and selenoproteins in mammals: extraordinary, essential, enigmatic, *Cell Mol Life Sci* (vol. 61), No. 16, pp. 1988-95. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15316649
- Schrauzer, G. N.; White, D. A. and Schneider, C. J. (1977): Cancer mortality correlation studies--III: statistical associations with dietary selenium intakes, *Bioinorg Chem* (vol. 7), No. 1, pp. 23-31. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=856291
- Schwarz, K. and Foltz, C. M. (1958): Factor 3 activity of selenium compounds, *J Biol Chem* (vol. 233), No. 1, pp. 245-51. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13563479
- Schweizer, U.; Michaelis, M.; Kohrle, J. and Schomburg, L. (2004): Efficient selenium transfer from mother to offspring in selenoprotein-P-deficient mice enables dose-dependent rescue of phenotypes associated with selenium deficiency, *Biochem J* (vol. 378), No. Pt 1, pp. 21-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14664694
- Schweizer, U. and Schomburg, L. (2005): New insights into the physiological actions of selenoproteins from genetically modified mice, *IUBMB Life* (vol. 57), No. 11, pp. 737-44. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16511966
- Schweizer, U.; Streckfuss, F.; Pelt, P.; Carlson, B. A.; Hatfield, D. L.; Kohrle, J. and Schomburg, L. (2005): Hepatically derived selenoprotein P is a key factor for kidney but not for brain selenium supply, *Biochem J* (vol. 386), No. Pt 2, pp. 221-6. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15638810
- Shamberger, R. J. and Frost, D. V. (1969): Possible protective effect of selenium against human cancer, *Can Med Assoc J* (vol. 100), No. 14, p. 682. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5776446
- Shedden, K.; Chen, W.; Kuick, R.; Ghosh, D.; Macdonald, J.; Cho, K. R.; Giordano, T. J.; Gruber, S. B.; Fearon, E. R.; Taylor, J. M. and Hanash, S. (2005): Comparison of seven methods for producing Affymetrix expression scores based on False Discovery Rates in disease profiling data, *BMC Bioinformatics* (vol. 6), p. 26. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15705192
- Sheehan, T. M. and Gao, M. (1990): Simplified fluorometric assay of total selenium in plasma and urine, *Clin Chem* (vol. 36), No. 12, pp. 2124-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2253359
- Siu, I. M.; Robinson, D. R.; Schwartz, S.; Kung, H. J.; Pretlow, T. G.; Petersen, R. B. and Pretlow, T. P. (1999): The identification of monoclonality in human aberrant crypt foci, *Cancer Res* (vol. 59), No. 1, pp. 63-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9892186
- Smits, R.; Kartheuser, A.; Jagmohan-Changur, S.; Leblanc, V.; Breukel, C.; de Vries, A.; van Kranen, H.; van Krieken, J. H.; Williamson, S.; Edelmann, W.; Kucherlapati, R.; Khan, P. M. and Fodde, R. (1997): Loss of Apc and the entire chromosome 18 but absence of mutations at the Ras and Tp53 genes in intestinal tumors from Apc1638N, a mouse model for Apc-driven carcinogenesis, *Carcinogenesis* (vol. 18), No. 2, pp. 321-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9054624
- Smits, R.; Kielman, M. F.; Breukel, C.; Zurcher, C.; Neufeld, K.; Jagmohan-Changur, S.; Hofland, N.; van Dijk, J.; White, R.; Edelmann, W.; Kucherlapati, R.; Khan, P. M. and Fodde, R. (1999): Apc1638T: a mouse model delineating critical domains of the adenomatous polyposis coli protein involved in tumorigenesis and development, *Genes Dev* (vol. 13), No. 10, pp. 1309-21. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10346819
- Sounni, N. E.; Janssen, M.; Foidart, J. M. and Noel, A. (2003): Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis, *Matrix Biol* (vol. 22), No. 1, pp. 55-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12714042
- Squires, J. E.; Stoytchev, I.; Forry, E. P. and Berry, M. J. (2007): SBP2 binding affinity is a major determinant in differential selenoprotein mRNA translation and sensitivity to nonsense-mediated decay, *Mol Cell Biol* (vol. 27), No. 22, pp. 7848-55. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17846120
- Sreeramaneni, R.; Chaudhry, A.; McMahon, M.; Sherr, C. J. and Inoue, K. (2005): Ras-Raf-Arf signaling critically depends on the Dmp1 transcription factor, *Mol Cell Biol* (vol. 25), No. 1, pp. 220-32. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15601844
- Stadtman, T. C. (1996): Selenocysteine, *Annu Rev Biochem* (vol. 65), pp. 83-100. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8811175
- Su, L. K.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B.; Preisinger, A. C.; Moser, A. R.; Luongo, C.; Gould, K. A. and Dove, W. F. (1992): Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene, *Science* (vol. 256), No. 5057, pp. 668-70. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1350108
- Suh, E. K.; Yang, A.; Kettenbach, A.; Bamberger, C.; Michaelis, A. H.; Zhu, Z.; Elvin, J. A.; Bronson, R. T.; Crum, C. P. and McKeon, F. (2006): p63 protects the female germ line during meiotic arrest, *Nature* (vol. 444), No. 7119, pp. 624-8. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17122775
- Sulkowski, S.; Kanczuga-Koda, L.; Koda, M.; Wincewicz, A. and Sulkowska, M. (2006): Insulin-like growth factor-I receptor correlates with connexin 26 and Bcl-xL expression in human colorectal cancer, *Ann N Y Acad Sci* (vol. 1090), pp. 265-75. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17384270
- Sun, X. and Maquat, L. E. (2002): Nonsense-mediated decay: assaying for effects on selenoprotein mRNAs, *Methods Enzymol* (vol. 347), pp. 49-57. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11898438
- Sutherland, R. M.; Sordat, B.; Bamat, J.; Gabbert, H.; Bourrat, B. and Mueller-Klieser, W. (1986): Oxygenation and differentiation in multicellular spheroids of human colon carcinoma, *Cancer Res* (vol. 46), No. 10, pp. 5320-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3756881
- Suzuki, K. T.; Sasakura, C. and Yoneda, S. (1998): Binding sites for the (Hg-Se) complex on selenoprotein P, *Biochim Biophys Acta* (vol. 1429), No. 1, pp. 102-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9920389
- Takahashi, M. and Wakabayashi, K. (2004): Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents, *Cancer Sci* (vol. 95), No. 6, pp. 475-80. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15182426
- Takai, D. and Jones, P. A. (2002): Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 99), No. 6, pp. 3740-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11891299
- Takebe, G.; Yanimizu, J.; Saito, Y.; Hayashi, T.; Nakamura, H.; Yodoi, J.; Nagasawa, S. and Takahashi, K. (2002): A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P, *J Biol Chem* (vol. 277), No. 43, pp. 41254-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12185074
- Tanaka, T.; Kohno, H.; Suzuki, R.; Hata, K.; Sugie, S.; Niho, N.; Sakano, K.; Takahashi, M. and Wakabayashi, K. (2006): Dextran sodium sulfate strongly promotes colorectal carcinogenesis in Apc(Min/+) mice: inflammatory stimuli by dextran sodium sulfate results in development of multiple colonic neoplasms, *Int J Cancer* (vol. 118), No. 1, pp. 25-34. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16049979
- Tatematsu, M.; Tsukamoto, T. and Inada, K. (2003): Stem cells and gastric cancer: role of gastric and intestinal mixed intestinal metaplasia, *Cancer Sci* (vol. 94), No. 2, pp. 135-41. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12708487
- Thanbichler, M. and Bock, A. (2002): The function of SECIS RNA in translational control of gene expression in *Escherichia coli*, *Embo J* (vol. 21), No. 24, pp. 6925-34. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12486013
- Valko, M.; Izakovic, M.; Mazur, M.; Rhodes, C. J. and Telser, J. (2004): Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Mol Cell Biochem* (vol. 266), No. 1-2, pp. 37-56. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15646026
- Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T.; Mazur, M. and Telser, J. (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int J Biochem Cell Biol* (vol. 39), No. 1, pp. 44-84. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16978905

- Vallejo, G. H.; Romero, C. J. and de Vicente, J. C. (2005): Incidence and risk factors for cancer after liver transplantation, *Crit Rev Oncol Hematol* (vol. 56), No. 1, pp. 87-99. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15979889
- Vernie, L. N. (1984): Selenium in carcinogenesis, *Biochim Biophys Acta* (vol. 738), No. 4, pp. 203-17. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6440591
- Voutsadakis, I. A. (2007): Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and colorectal carcinogenesis, *J Cancer Res Clin Oncol* (vol. 133), No. 12, pp. 917-28. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17659359
- Wang, D. and DuBois, R. N. (2007): Inflammatory mediators and nuclear receptor signaling in colorectal cancer, *Cell Cycle* (vol. 6), No. 6, pp. 682-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17374999
- Waters, D. J.; Chiang, E. C.; Cooley, D. M. and Morris, J. S. (2004): Making sense of sex and supplements: differences in the anticarcinogenic effects of selenium in men and women, *Mutat Res* (vol. 551), No. 1-2, pp. 91-107. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15225584
- Weiss Sachdev, S. and Sunde, R. A. (2001): Selenium regulation of transcript abundance and translational efficiency of glutathione peroxidase-1 and -4 in rat liver, *Biochem J* (vol. 357), No. Pt 3, pp. 851-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11463357
- Whanger, P. D. (2004): Selenium and its relationship to cancer: an update, *Br J Nutr* (vol. 91), No. 1, pp. 11-28. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14748935
- Whitehead, R. H.; Macrae, F. A.; St John, D. J. and Ma, J. (1985): A colon cancer cell line (LIM1215) derived from a patient with inherited nonpolyposis colorectal cancer, *J Natl Cancer Inst* (vol. 74), No. 4, pp. 759-65. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3857372
- Wingler, K.; Bocher, M.; Flohe, L.; Kollmus, H. and Brigelius-Flohe, R. (1999): mRNA stability and selenocysteine insertion sequence efficiency rank gastrointestinal glutathione peroxidase high in the hierarchy of selenoproteins, *Eur J Biochem* (vol. 259), No. 1-2, pp. 149-57. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9914487
- Wu, W. S. (2006): The signaling mechanism of ROS in tumor progression, *Cancer Metastasis Rev* (vol. 25), No. 4, pp. 695-705. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17160708
- Yan, J. and Barrett, J. N. (1998): Purification from bovine serum of a survival-promoting factor for cultured central neurons and its identification as selenoprotein-P, *J Neurosci* (vol. 18), No. 21, pp. 8682-91. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9786975
- Yan, W. and Chen, X. (2006): GPX2, a direct target of p63, inhibits oxidative stress-induced apoptosis in a p53-dependent manner, *J Biol Chem* (vol. 281), No. 12, pp. 7856-62. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16446369
- Yang, A.; Schweitzer, R.; Sun, D.; Kaghad, M.; Walker, N.; Bronson, R. T.; Tabin, C.; Sharpe, A.; Caput, D.; Crum, C. and McKeon, F. (1999): p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development, *Nature* (vol. 398), No. 6729, pp. 714-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10227294
- Yoo, M. H.; Xu, X. M.; Carlson, B. A.; Patterson, A. D.; Gladyshev, V. N. and Hatfield, D. L. (2007): Targeting thioredoxin reductase 1 reduction in cancer cells inhibits self-sufficient growth and DNA replication,

- PLoS ONE (vol. 2), No. 10, p. e1112. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17971875
- You, S.; Ohmori, M.; Pena, M. M.; Nassri, B.; Quiton, J.; Al-Assad, Z. A.; Liu, L.; Wood, P. A.; Berger, S. H.; Liu, Z.; Wyatt, M. D.; Price, R. L.; Berger, F. G. and Hrushesky, W. J. (2006): Developmental abnormalities in multiple proliferative tissues of Apc(Min/+) mice, *Int J Exp Pathol* (vol. 87), No. 3, pp. 227-36. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16709231
- Zamurs, L.; Pouliot, N.; Gibson, P.; Hocking, G. and Nice, E. (2003): Strategies for the purification of laminin-10 for studies on colon cancer metastasis, *Biomed Chromatogr* (vol. 17), No. 2-3, pp. 201-11. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12717810
- Zhuo, H.; Smith, A. H. and Steinmaus, C. (2004): Selenium and lung cancer: a quantitative analysis of heterogeneity in the current epidemiological literature, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (vol. 13), No. 5, pp. 771-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15159309
- Zinoni, F.; Heider, J. and Bock, A. (1990): Features of the formate dehydrogenase mRNA necessary for decoding of the UGA codon as selenocysteine, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 87), No. 12, pp. 4660-4. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2141170

Anhang

Auflistung verwendeter Oligonukleotide: Die Tabellen umfassen alle in der Arbeit verwendeten Primer. Neben den entsprechenden Genen sind die Bindungsstellen der Primer in der entsprechenden mRNA bzw. Genom angegeben.

Primer für Genotypisierung

Bezeichnung	Sequenz in 5'- NNNNN -3'	Gen
Fm-APCjax	GCCATCCCTTCACGTTAG	Chromosom 18; 15,0 cM
Fm-APC2jax	TTCCACTTTGGCATAAGGC	Chromosom 18; 15,0 cM
Rm-APCjax	TTCTGAGAAAGACAGAAGTTA	Chromosom 18; 15,0 cM
FKOLZ2	GTTCTGTGACTATGCATTACAG	Chromosom 15; 5,9 cM
RKOLZ2	TGGTACGTAAGCTTGATTGATC	Chromosom 15; 5,9 cM
Rev-mSEPP02	CACAAGTATCAGCTGGCTTGAAG	Chromosom 15; 5,9 cM

Primer für Real time-PCR

Bezeichnung	Sequenz in 5'- NNNNN -3'	Gen	Bindung
Fm-18S	TTGACGGAAGGGCACCACCAG	NR_003278	1202 bp
Rm-18S	GCACCACCACCCACGGAATCG	NR_003278	1331 bp
Fm-GAPDH	CTGAGGACCAGGTTGTCTCC	NM_008084	874 bp
Rm-GAPDH	GCCTCTCTTGCTCAGTGCC	NM_008084	1099 bp
Fm-CcnC	GAGATGGCAACTATTCTTAGTAAG	NM_016746	28 bp
Rm-CcnC	GAGGTAAACCTGAAATGTCTGTG	NM_016746	315 bp
Fm-cGPx	ATCAGTTCGGACACCAGGAG	NM_008160	267 bp
Rm-cGPx	CATTCCGCAGGAAGGTAAAG	NM_008160	425 bp
Fm-GIGPx	ACCAGTTCGGACATCAGGAG	NM_030677	337 bp
Rm-GIGPx	GGTAGGCAAAGACAGGATGC	NM_030677	486 bp
Fm-MT1	CTTCTCCTCACTTACTCCGTAG	NM_013602	41 bp
Rm-MT1	TTCGTCACATCAGGCACAG	NM_013602	280 bp
Fm-MT2	CAACCGCCGCCTCCACTC	NM_008630	45 bp

Rm-MT2	GCACTTGTCGGAAGCCTCTTTG	NM_008630	236 bp
Fm-Ghrn	GAAGCCACCAGCTAAACTGC	NM_021488	168 bp
Rm-Ghrn	GCCATGCTGCTGATACTGAG	NM_021488	327 bp
Fm-Sepp	AAGATCGCTTACTGTGAGGAG	NM_001042614	645 bp
Rm-Sepp	TTGTTGTGGTGTGTTGTGGTG	NM_001042614	790 bp
Fm-Ang1	CAGAGAAAACCTTAAGAATGAGCAAG	NM_007447	343 bp
Rm-Ang1	CTGCTGACTATAGACTGAAAAATG	NM_007447	524 bp
Fm-BclXs	CCCATGGCAGCAGTGAAGCAAG	NM_009743	436 bp
Rm-BclXs	GTCACTCCGACTGAAGAGTGAG	NM_009743	895 bp
Fm-JunD1	CAAGACCCTCAAAAGCCAGAAC	NM_010592	990 bp
Rm-JunD1	GCACCGAGTCTCGAAAGAGTC	NM_010592	1206 bp
Fm-GAPSBP	GCTGCCTGATGTCATCCGTATCTG	noch fehlend	
Rm-GAPSBP	TTACCTCGAGTCTTGGAGTTCCTTG	noch fehlend	
Fm-NaSi1	GTGTTGCTGTGGTGATGCTAG	NM_019481	1707 bp
Rm-NaSi1	GAGAAAGAGCAAGCACATAGATG	NM_019481	2076 bp
Fm-CTGF	GCAGCGGTGAGTCCTTCC	NM_010217	548 bp
Rm-CTGF	AATGTGTCTTCCAGTCGGTAGG	NM_010217	779 bp
Fm-Keap1	TACGATGGGCAGGACCAGTTGAAC	NM_016679	2682 bp
Rm-Keap1	GATTTGAGTTCTGGTCTTCCACAAG	NM_016679	3189 bp
Fm-Myb	CTCAAACCACTGGGCAGAGAACAG	NM_010848	1880 bp
Rm-Myb	CTGCTCTCAACTGTTGTACCACAAC	NM_010848	2309 bp
Fm-PPARg	AACCTGCGGAAGCCCTTTGG	NM_011146	1186 bp
Rm-PPARg	TGGAGCACCTTGGCGAACAG	NM_011146	1433 bp
Fm-Saa1	GAGACACCAGGATGAAGCTACTC	NM_009117	23 bp
Rm-Saa1	AGCTACTTCAGTGTTCCTAGGTAG	NM_009117	488 bp
Fm-SP4	GTCCAGAGTGTTCTAAAAGGTTTATG	NM_009239	2256 bp
Rm-SP4	CAGGATGTTAAAGGAGGGAAGATTC	NM_009239	2784 bp

Fm-Timp2	CTGAACCACAGGTACCAGATG	NM_011594	751 bp
Rm-Timp2	CAGAGCTAGGGTACCCTTAATG	NM_011594	906 bp
Fm-CcnD1	GCGGCTGCTTCCTCCATCC	NM_007631	914 bp
Rm-CcnD1	CCCGTCCGTGTCCTGAGTAAAC	NM_007631	1083 bp
Fm-COX2	GCCCAGCACTTCACCCATCAG	NM_011198	662 bp
Rm-COX2	GACCAGGCACCAGACCAAAGAC	NM_011198	950 bp
Fm-bCatenin	GCCGTTGCGCTTCATTATGG	NM_007614	1662 bp
Rm-bCatenin	CGAGCAAGGATGTGGAGAG	NM_007614	1957 bp
Fm-Adam21	TGCTCAGGCTCTGCCAGGACAC	NM_020330	399 bp
Rm-Adam21	TGGCCCTGCTGGTCACCTTCAG	NM_020330	681 bp
Fm-Col4a5	GTCCTCCTGGTTCTCCTGGTC	NM_007736	3857 bp
Rm-Col4a5	AGTCCTGGTGGTCCTTGATCTC	NM_007736	4082 bp
Fm-Fgf17	ACCAGTACCTGAGGGACCAG	NM_008004	953 bp
Rm-Fgf17	TGCTGCCGAATGTATCTGTCTC	NM_008004	1340 bp
Fm-IGF1	GTCGTCTTCACACCTCTTCTAC	NM_184052	1376 bp
Rm-IGF1	TCTCCAGTCTCCTCAGATCAC	NM_184052	1614 bp
Fm-IGF2	CCTGAGTTGGGAGTGGAGTC	NM_010514	3456 bp
Rm-IGF2	CGCCTGATGTAACCTGTCTAC	NM_010514	3721 bp
Fm-IGFBP2	AGACGCTACGCTGCTATC	NM_008342	360 bp
Rm-IGFBP2	TGCTGTTCATTGACCTTCTC	NM_008342	627 bp
Fm-IGFBP1	CGTGCGTTGCCAGGAGAG	NM_008341	462 bp
Rm-IGFBP1	GGAGACCACAGCAGCCTTTG	NM_008341	599 bp
Fm-IGFBP3	CTGAGGGCGCTGCTGAATG	NM_008343	449 bp
Rm-IGFBP3	TCTGGGTGTCTGTGCTTTGAG	NM_008343	731 bp
Fm-IL6	TTCCATCCAGTTGCCTTCTTG	NM_031168	56 bp
Rm-IL6	TCATTTCCACGATTTCCCAGAG	NM_031168	227 bp
Fm-MMP9	TCTCTGGTGTGCCCTGGAAGTC	NM_013599	2021 bp

Rm-MMP9	GGTGGTGGTGGTGGTGGTCTC	NM_013599	2264 bp
Fm-Myc	CCTGACGACGAGACCTTC	NM_010849	984 bp
Rm-Myc	GAGCGGGTAGGGAAAGAC	NM_008750	1226 bp
Fm-Nxn	TCTCCCCCTCCTCCCCCTCTG	NM_008750	1414 bp
Rm-Nxn	GGTCCTTGCTTGCTCACTCTG	NM_008750	1688 bp
Fm-PHGPx	AGGAGCCCCAGGTGATAGAG	NM_001037741	731 bp
Rm-PHGPx	GCACGCCAGGTCCTCAGG	NM_001037741	907 bp
Fm-Ptges2	TACCGAACACCCGCTGAG	NM_133783	765 bp
Rm-Ptges2	CCTCCAGACCCTCCATCAC	NM_133783	1059 bp
Fm-Mcpt1	AGGACAGATGTGGTGGGTTTC	NM_008570	175 bp
Rm-Mcpt1	CCAGGGTCGATAAAGTCAGAGG	NM_008570	454 bp
Fm-Mcpt2	ATCAAGCCTGGGAAGATGTG	NM_008571	440 bp
Rm-Mcpt2	GGAGATTGCGGTGAAGACTG	NM_008571	724 bp
Fm-Cpa3	GCATTGGCACTGACCTCAAC	NM_007753	740 bp
Rm-Cpa3	AGCATCTGCGAGTAGGAATGG	NM_007753	935 bp
Fm-Saa3	TGTGGCGAGCCTACTCTGAC	NM_011315	138 bp
Rm-Saa3	CAGCAGGTCGGAAGTGTTG	NM_011315	383 bp
Fm-Dmft1	GCGGCTGCTTCCTCCATCC	NM_011806	28 bp
Rm-Dmft1	CCCGTCCGTGTCCTGAGTAAAC	NM_011806	315 bp
Fm-Sep15	ATGGTCGCCTAACTAACTC	NM_053102	154 bp
Rm-Sep15	CAGACGCCGCTTGAAACG	NM_053102	380 bp
Fm-SepX1	CCCAGACAGTGTGACCAAGTG	NM_013759	219 bp
Rm-SepX1	TTGACCAGAGCAGATCATTCGG	NM_013759	511 bp
Fm-Ednrb	TCTACTTCTGCTTGCCGCTAG	NM_007904	1060 bp
Rm-Ednrb	GTGTGGATTGCTCTGGTCATAC	NM_007904	1289 bp
Fm-Fgfr4	CTGGTGACCGAGGATGATG	NM_008011	2008 bp
Rm-Fgfr4	CGCAGCAGTGAGAAGAGC	NM_008011	2261 bp

Fm-Cidea	CTTCCTCGGCTGTCTCAATGTC	NM_007702	633 bp
Rm-Cidea	GGATGGCTGCTCTTCTGTATCG	NM_007702	834 bp
Fm-TNF	CGTGGAAGTGGCAGAAGAG	NM_013693	183 bp
Rm-TNF	GGCTACAGGCTTGTCCTC	NM_013693	435 bp
Fm-Trp53	TTTGAGGTTCGTGTTTGTG	NM_011640	1335 bp
Rm-Trp53	CATGGGCATCCTTTAACTC	NM_011640	1590 bp
Fm-APC	GGCGGAAGCGGAGAGGTCATC	NM_007462	1022 bp
Rm-APC	ACTACTGGAGGCTGCGGTGTTG	NM_007462	1133 bp

Danksagung

Meinen aufrichtigen Dank möchte ich an dieser Stelle zahlreichen Begleitern und Mitstreitern aussprechen, welche durch Wirkung und Anteilnahme mir diese vorliegende Dissertationsarbeit ermöglicht bzw. mich bei dieser unterstützt haben.

An vorderster Stelle sei meinem Betreuer, Dr. Lutz Schomburg, gedankt, welcher mir es ermöglichte, dieses äußerst interessante Thema zu bearbeiten und mir in jeglichem Wissenschaftlichen wie auch im Privaten mit Rat und Tat zur Seite stand. Lutz, danken möchte ich Dir auch für den Lebensumstand, in den Verlauf dieser Arbeit, mit Katja Schreiber vertraut zu werden, was neben der produktiven wissenschaftlichen Arbeit auch in Form meiner innig geliebten Tochter Alejanda Selene Früchte trug.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Josef Köhrle für sein stetes Interesse am Fortgang und Erfolg dieser Arbeit, wie auch für die zahlreichen Möglichkeiten, an wissenschaftlichen Tagungen teilzunehmen und sein stetiges Bemühen, mich in meiner wissenschaftlichen Ausbildung zu fördern und zu fordern. Auch sei nicht unerwähnt, dass das sehr angenehme Arbeitsklima im Institut für Experimentelle Endokrinologie entscheidend dem Führungsstil von Herrn Prof. Josef Köhrle und Dr. Lutz Schomburg zu verdanken ist.

Ein großes Dankeschön gilt auch all jenen, die mich in der praktischen Arbeit unterstützt haben. Als da wären:

- Dr. U. Ungethüm, (LFGF, der Charite, Berlin) für die Hybridisierung der Genchips
- Dr. R.J. Kuban, (LFGF, der Charite, Berlin) für die Normalisierung der Genchips
- Dr. W. Weichert und Dr. C. Denkert (Institut für Pathologie der Charite) für die histopathologische Klassifizierung der Tumore
- Dr. K. Neumann (Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité) für die Beratung in Fragen der Statistik
- den Mitarbeitern der Tierhaltung

und vor allem alle Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Endokrinologie der Charite, wobei die Mithilfe von Silke Kappler, Katja Schreiber, Vartiter Seher, Conny Riese, Kostja Renko, Ulrich Schweizer wie auch Peter Hofmann hervorzuheben ist.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Werner Kloas, sei mein herzlicher Dank ausgesprochen, für die Betreuung meiner Dissertation von Seiten der Humboldt- Universität wie auch für die Möglichkeit, seinen fachlichen versierten Rat einzuholen.

Danken möchte ich auch all jenen, die sich die Mühe gemacht haben, die Rohfassung dieser Arbeit zu lesen und zu kommentieren (Lutz, Suse, Kai, Tobias, Thomas und meiner Mutter).

Mein herzlicher Dank sei auch all jenen versichert, welche ich eventuell in dieser persönlichen Ansprache übergangen oder vergessen haben sollte. – Dies war nicht mein Anliegen.

Danken möchte ich auch Dr. Steffi Oesterreich (Baylor College of Medicine, Houston), nach meinem Chemiestudium in mir das Interesse für die Molekularbiologie geweckt zuhaben.

Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich für ihre Unterstützung und den familiären Rückhalt, und ich möchte mich bei allen Freunden, Bekannten und Verwandten, vor allem bei meiner Tochter und Katja, dafür entschuldigen, dass bestimmte Arbeiten Priorität vor privaten Belangen hatten; ich verknüpfe es mit der Hoffnung, dass sich dies in der kommenden Zeit ändert.

Veröffentlichungen:

Oesterreich S, Zhang Q, Hopp T, Fuqua SA, Michaelis M, Zhao HH, Davie JR, Osborne CK, Lee AV. Tamoxifen-bound estrogen receptor (ER) strongly interacts with the nuclear matrix protein HET/SAF-B, a novel inhibitor of ER-mediated transactivation. *Mol Endocrinol*. 2000 Mar;14(3):369-81.

Misselwitz B, Schmitt-Willich H, Michaelis M, Oellinger JJ. Interstitial magnetic resonance lymphography using a polymeric t1 contrast agent: initial experience with Gadomer-17. *Invest Radiol*. 2002 Mar;37(3):146-51.

Schweizer U, Michaelis M, Köhrle J, Schomburg L. Efficient selenium transfer from mother to offspring in selenoprotein-P-deficient mice enables dose-dependent rescue of phenotypes associated with selenium deficiency. *Biochem J*. 2004 Feb 15;378(Pt 1):21-6.

Streckfuss F, Hamann I, Schomburg L, Michaelis M, Sapin R, Klein MO, Köhrle J, Schweizer U. Hepatic deiodinase activity is dispensable for the maintenance of normal circulating thyroid hormone levels in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Nov 18;337(2):739-45.

Schomburg L, Riese C, Michaelis M, Griebert E, Klein MO, Sapin R, Schweizer U, Köhrle J. Synthesis and metabolism of thyroid hormones is preferentially maintained in selenium-deficient transgenic mice. *Endocrinology*. 2006 Mar;147(3):1306-13.

Riese C, Michaelis M, Mentrup B, Götz F, Köhrle J, Schweizer U, Schomburg L. Selenium-dependent pre- and posttranscriptional mechanisms are responsible for sexual dimorphic expression of selenoproteins in murine tissues. *Endocrinology*. 2006 Dec;147(12):5883-92.

Michaelis M, Schweizer U, Weichert W, Denkert C, Brigelius-Flohé R, Köhrle J, Schomburg L. Selenoprotein P deficiency augments intestinal cancer formation in APCmin mice. *submission to Proc Natl Acad Sci U S A in progress*.

Kongressbeiträge (Oralepresentation):

Michaelis M, Schomburg L, Schweizer U, Köhrle J. Der Einfluss von Selenoprotein P auf die 5'-Deiodase in der Leber. 19. Arbeitstagung für Experimentelle Schilddrüsenforschung (AESF), Dez. 2003, Halle.

Michaelis M, Schomburg L, Schweizer U, Köhrle J. Towards an analysis of the growth defect in mice that lack the selenium transport protein SePP. 48. Symposion der Deutschen Endokrinologischen Gesellschaft, März 2004, Dresden.

Michaelis M, Schweizer U, Weichert W, Brigelius-Flohé R, Denkert C, Köhrle J, Schomburg L. Selenoprotein P deficiency augments intestinal cancer formation in APCmin mice. 8th International Symposium on Selenium Biology and Medicine, Juni 2006, Madison WI, USA.

Kongressbeiträge (Posterpräsentation)*:

Michaelis M, Schomburg L, Schweizer U, Köhrle J. Impact of selenium on growth in transgenic mice. *Summer School für Endokrinologie, Juli 2004, Bregenz, Österreich.*

Michaelis M, Schomburg L, Schweizer U, Köhrle J. Impact of selenium on growth in transgenic mice. *49. Symposium der Deutschen Endokrinologischen Gesellschaft, März 2005, Münster.*

Michaelis M, , Schweizer U, Weichert W, Brigelius-Flohé R, Denkert C, Köhrle J, Schomburg L. Selenoprotein P deficiency augments intestinal cancer formation in APCmin mice. *22. Jahrestagung der Gesellschaft für Mineralstoffe und Spurenelemente GMS, November 2006, Berlin.*

Michaelis M, Hofmann PJ, Götz F, Quinkler M. Testosterone increases kidney weight in orchietomized male Wistar rats but not dihydrotestosterone. *Society for Endocrinology BES, April 2008, Harrogate, UK.*

*Coautorenschaft wurde nicht aufgeführt.

Buchbeiträge und Abstract:

Schweizer U, Wirth E, Werner M, Renko K, Michaelis M, Schomburg L, Köhrle J, Streckfuß F, Roth S. Transgenic mouse models reveal the role of selenoproteins in brain development and function. *Köhrle J und Schmutzler C: Mineralstoffe – Molekularbiologie – Medizin: Herbert Utz Verlag · München (2007), ISBN 978-3-8316-0732-7 , p63 – 68.*

Riese C, Michaelis M, Götz F, Köhrle J, Schweizer U, Schomburg L. Geschlechterspezifische Regulation der Expression des Selenoenzyms Deiodase I. *Köhrle J und Schmutzler C: Mineralstoffe – Molekularbiologie – Medizin: Herbert Utz Verlag · München (2007), ISBN 978-3-8316-0732-7 , p93 – 99.*

Michaelis M, Schweizer U, Weichert W, Denkert C, Florian S, Brigelius-Flohé R, Köhrle J, Schomburg L. Verstärkter Darmkrebs bei Mäusen mit reduzierter Selenoprotein P Expression. *Köhrle J und Schmutzler C: Mineralstoffe – Molekularbiologie – Medizin: Herbert Utz Verlag · München (2007), ISBN 978-3-8316-0732-7 , p115 – 12*

Eidestattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und mit keinen anderen als den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Marten Michaelis